

Inhibition der Müllerzellschwellung durch Erythropoietin unter hypotonen Bedingungen

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Dr. med.

an der Medizinischen Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von: Katja Sauer geb. Krügel
Geburtsdatum: 24.08.1985
Geburtsort: Schlema

angefertigt an der Universität Leipzig im Paul-Flechsig-Institut für Hirnforschung, Abteilung
Pathophysiologie der Neuroglia

Betreuer: Dr. rer. nat. Antje Grosche geb. Wurm,
Prof. Dr. Andreas Bringmann

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 29.01.2013

Inhaltsverzeichnis:

1	Einleitung	1
	1.1 Zielstellung	5
2	Material und Methoden	6
	2.1 Allgemeines	6
	2.1.1 Tiere	6
	2.1.2 Retinapräparation	6
	2.1.3 Mikroskop	6
	2.2 Schwellungsexperimente	7
	2.2.1 Fluoreszenzfarbstoff	7
	2.2.2 Perfusionslösungen	7
	2.2.3 Erythropoietin	8
	2.2.4 Applizierte Substanzen	8
	2.2.5 Retinapräparation und Schnittherstellung	11
	2.2.6 Messanordnung	11
	2.2.7 Versuchsschema	12
	2.2.9 Ausmessen der Müllerzellquerschnittsflächen	14
	2.2.10 Auswertung der Messergebnisse und statistische Analyse	14
	2.3 Immunfluoreszenz	15
	2.3.1 Darstellung der Erythropoietinrezeptoren in einer Dreifachfärbung im Retinaschnitt	15
	2.3.2 Darstellung von Erythropoietinrezeptoren an isolierten Müllerzellen	15
3	Ergebnisse	17
	3.1 Die Müllerzellschwellung	17
	3.2 Der Einfluss von EPO auf die Müllerzellschwellung	17
	3.2.1 Konzentrationsabhängigkeit der Schwellungsinhibition durch EPO	19
	3.3 EPO und die Wirkung von Entzündungsmediatoren	19
	3.4 Die Signalkaskade der Schwellungsinhibition	22
	3.4.1 Die Beteiligung von K^+ / Cl^- - Kanälen an der Schwellungsinhibition durch EPO	24
	3.4.2 Beteiligung von Adenosinrezeptoren an der Schwellungsinhibition durch EPO	25
	3.4.3 Beteiligung von P2Y-Rezeptoren	27
	3.4.4 Involvierung von Glutamatrezeptoren in die schwellungsinhibierende Wirkung von EPO	29
	3.4.5 Möglichkeiten der Glutamatfreisetzung innerhalb der durch EPO aktivierten Signalkaskade	30
	3.4.6 Beteiligung von VEGF an der durch EPO induzierten Signalkaskade	33
	3.4.7 Durch EPO induzierte VEGF-Ausschüttung	34
	3.4.8 EPO- Rezeptorsignaltransduktion	35
	3.5 Die Lokalisierung von EPO- Rezeptoren im Netzhautschnitt und auf isolierten Müllerzellen	38
4	Diskussion	42
	4.1 Die durch Bariumionen induzierte Müllerzellschwellung als Pathologiemodell	42

	4.2 Die EPO-Wirkung auf die Schwellung von Müllerzellen	44
	4.3 Der grundlegende Signalweg der Schwellungsinhibition wird durch EPO aktiviert	44
	4.4 Die intrinsische Aktivität der Signalkaskade	50
	4.5 Die EPO-Applikation bewirkt eine autokrine VEGF-Ausschüttung bei Müllerzellen	50
	4.6 Veränderung der Expression von EPO-Rezeptoren in der diabetischen Retina	53
	4.7 Die Bedeutung der Schwellungsinhibition durch EPO bei Entzündungsgeschehen	55
	4.8 Die potentielle Bedeutung von EPO für die Behandlung von Netzhaut- und Hirnödemen	56
5	Zusammenfassung	58
6	Literaturverzeichnis	61
7	Anlagen	71

Bibliographische Beschreibung

Krügel, Katja

Inhibition der Müllerzellschwellung durch Erythropoietin unter hypotonen Bedingungen

Universität Leipzig, Dissertation, Medizinische Fakultät

74 Seiten, 2 Seiten Inhaltsverzeichnis, 143 Literaturstellen, 1 Tabelle, 30 Abbildungen, 1 Abkürzungsverzeichnis

Referat:

In der Einleitung der Arbeit wird herausgestellt, dass die in der Netzhaut von Säugetieren vorherrschenden Gliazellen die Müllerzellen sind. Die Müllerzellen der Netzhaut können als Modell für die Makrogliazellen im zentralen Nervensystem (ZNS) gelten und spielen bei der Regulation der Wasser- und Ionenhomöostase im retinalen Gewebe eine entscheidende Rolle. Unter hypotonen Bedingungen reagieren Müllerzellen in postischämischen und diabetischen Netzhäuten der Ratte mit einer Zellschwellung. Diese Zellschwellung in hypotonem Milieu kann auch beobachtet werden, wenn in Kontrollnetzhäuten die K^+ -Kanäle der Müllerzellen mit Ba^{2+} blockiert werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des Erythropoietins (EPO) auf die Müllerzellschwellung unter hypotonen Bedingungen untersucht. Dazu wurden Netzhäute der Ratte entnommen, präpariert und mit einem Fluoreszenzfarbstoff angefärbt. Es erfolgte die Inkubation mit Ba^{2+} und eine Untersuchung der Müllerzellen im Laser Scanning Mikroskop. Das Netzhautpräparat wurde dabei ständig mit einer extrazellulären Lösung perfundiert, um die Zellen in einem vitalen Zustand untersuchen zu können. Außerdem erfolgte über die Perfusion die Zugabe von Testsubstanzen. Mit Hilfe eines speziellen Software-Programms des Mikroskops konnte die Querschnittsfläche der Müllerzellsomata ausgemessen werden. Durch wiederholte Ausmessungen über einen Zeitraum von ca. 5 min ließen sich Veränderungen der Somafläche feststellen. Zur Lokalisierung des EPO-Rezeptors in der Netzhaut und auf Müllerzellen wurden Immunfluoreszenzfärbungen von Netzhäuten und isolierten Müllerzellen angefertigt.

In der Arbeit wurde nachgewiesen, dass die Zugabe von EPO die Müllerzellschwellung inhibiert. Der daran beteiligte Signalweg konnte durch Zugabe von Antagonisten und Agonisten für verschiedene Rezeptoren, Ionenkanalblockern und Enzyminhibitoren charakterisiert werden. So sind in den Signalweg der Schwellungsinhibition durch EPO eine VEGF-Ausschüttung, verschiedene Proteinkinasen, ein Anstieg der intrazellulären freien Ca^{2+} -Konzentration, eine Freisetzung von Glutamat, ATP und Adenosin mit nachfolgender Aktivierung der entsprechenden Rezeptoren involviert. Als morphologisches Korrelat des Ausgangspunktes des Signalweges konnte der EPO-Rezeptor auf Müllerzellen nachgewiesen werden.

Es wird geschlussfolgert, dass die gliale Zellschwellung zur Pathogenese von Ödemen des ZNS beiträgt. Erkrankungen, die mit der Entstehung eines Hirnödems oder eines Ödems in der Netzhaut einhergehen, könnten in Zukunft zielgerichteter durch EPO therapiert werden.

AA	Arachidonsäure
A.bidest.	Bidestilliertes Wasser
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AQP	Aquaporin (Wasserkanal)
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
Ba ²⁺	Bariumionen
Ca ²⁺	Calciumionen
cAMP	Zyklisches Adenosin-5'-monophosphat
CFTR	Zystische-Fibrose-Transmembranleitfähigkeits-Regulator
Cl ⁻	Chloridionen
Cy2/3	Carbocyanin 2/3
DAG	Diazylglyzerol
DMSO	Dimethylsulfoxid
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
EPO	Erythropoietin
EZL	Extrazellulärlösung
GCL	Ganglienzellschicht
ILM	Innere Grenzmembran
INL	Innere Körnerschicht
IP3	Inositol-(1,4,5)-triphosphat
IPL	Innere plexiforme Schicht
Jak-2	Januskinase 2
K ⁺	Kaliumionen
Kir	Einwärts rektifizierender (gleichrichtender) K ⁺ -Kanal
LSM	Laser Scanning Microscope
MAP-Kinase	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
mGluR	Metabotroper Gutamat-Rezeptor
MW	Mittelwert
n	Anzahl der gemessenen Zellen
Na ⁺	Natriumionen
NaOH	Natriumhydroxid
NFL	Nervenfaserschicht
ns	Nicht signifikant
NTPDase2	Nukleosidtriphosphatdiphosphohydrolase 2
OLM	Äußere Grenzmembran
ONL	Äußere Körnerschicht
OPL	Äußere Plexiforme Schicht
P	Irrtumswahrscheinlichkeit
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
TTX	Tetrodotoxin
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

Für die Forschung am Zentralnervensystem (ZNS) ist die Retina zu einem häufig genutzten Modell geworden. Im Vergleich zum Gehirn ist die Netzhaut besser zugänglich und relativ übersichtlich aufgebaut (Reichenbach 1999). Die Retina geht als Teil des ZNS embryonal aus einer Ausstülpung des Neuralrohrs hervor und ist für die visuelle Wahrnehmung der Umwelt verantwortlich. Es wird geschätzt, dass wir mehr als 80% der uns bewussten Informationen über die Netzhaut aufnehmen (Reichenbach 2008).

Die Netzhaut kleidet den Augenhintergrund aus und besteht aus sechs Schichten, die neben Neuronen auch Mikro- und Makrogliazellen enthalten. Wie in der Abb. 1 zu sehen, wird die Retina zum Glaskörper hin von der inneren Grenzmembran (ILM) abgeschlossen, der die Nervenfaserschicht (NFL) anliegt. Darunter befindet sich die Ganglienzellschicht (GCL) mit den Ganglienzellsomata. Als nächstes schließen sich die innere plexiforme Schicht (IPL), mit zahlreichen Fortsätzen und Synapsen neuronaler und glialer Zellen, und die innere Körnerschicht (INL) mit den Somata der Müllerzellen, Amakrin-, Horizontal- und Bipolarzellen an. Weiter distal liegen die äußere plexiforme Schicht (OPL) mit den synaptischen Kontakten zwischen Photorezeptoren und Bipolarzellen und die äußere Körnerschicht (ONL). In der Letztgenannten befinden sich die Somata der Photorezeptorzellen, der Stäbchen und Zapfen. Die Retina wird vom subretinalen Raum durch die äußere Grenzmembran (OLM) abgegrenzt, die durch Zonulae adherentes zwischen Müllerzellen und Photorezeptoren gebildet wird.

In der Säugernetzhaut existieren drei Typen von Gliazellen: Mikrogliazellen und zwei Formen der neurosupportiven Makrogliazellen, Astrozyten und Müllerzellen (Bringmann et al. 2006). Müllerzellen sind die dominierende Glia in der Säugerretina. Sie durchspannen die Retina durch alle sechs Schichten. Die Somata der Müllerzellen befinden sich in der inneren Körnerschicht, ihr distaler Fortsatz erstreckt sich in die äußere Körnerschicht und umschneidet dort die Zellkörper der Photorezeptoren. In den Subretinalraum ragen Mikrovilli der Müllerzellen hinein. Der proximale Fortsatz durchzieht die innere plexiforme Schicht und endet in der Ganglienzellschicht in einem konischen Endfuß, der Kontakt zum Glaskörper hat. Von den Stammfortsätzen gehen zahlreiche kleinere Fortsätze aus, die in den plexiformen Schichten Kontakte zu

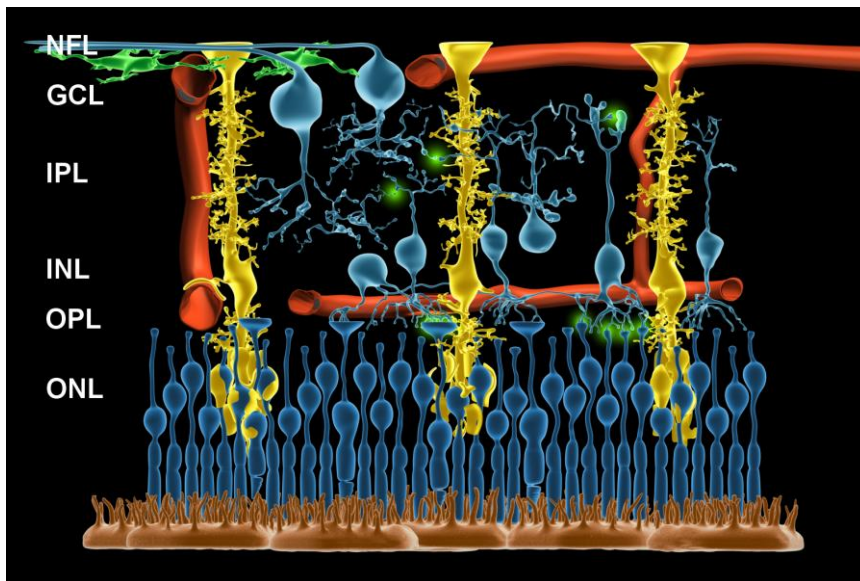


Abbildung 1: Halbschematische Darstellung einer vaskularisierten Netzhaut mit ihren verschiedenen Zelltypen. Blau dargestellt sind die verschiedenen Neuronentypen der Netzhaut mit ihren synaptischen Kontakten (grüne Punkte) in der äußeren und inneren plexiformen Schicht (OPL/IPL). In der Ganglienzellschicht (GCL)/Nervenfaserschicht (NFL) befinden sich, in grün dargestellt Astrozyten. In rot sichtbar sind die Blutgefäße der inneren und äußeren Retinaschichten. Die gesamte Netzhaut durchspannend, sind die Müllerzellen in der inneren Körnerschicht (INL) gelb dargestellt. Unterhalb der äußeren Körnerschicht (ONL) befinden sich die Zellen des retinalen Pigmentepithels in braun.

neuronalen Strukturen herstellen. Außerdem existieren in vaskularisierten Netzhäuten Müllerzellfortsätze, die an den retinalen Blutgefäßen enden. Somit bilden Müllerzellen sowohl eine anatomische, als auch eine funktionelle Verbindung zwischen retinalen Neuronen, retinalen Blutgefäßen, dem Glaskörper und dem subretinalen Raum (Bringmann et al. 2006).

Einige der wichtigsten Aufgaben der Müllerzellen sind die Bereitstellung von Pyruvat und Laktat für den neuronalen Zitratzyklus, der Abtransport von neuronalem Kohlendioxid, der Schutz der Neuronen vor freien Radikalen durch Glutathionsynthese, das Recycling von Transmittern wie Glutamat und von Sehfärbstoffen und die Aufrechterhaltung der Wasser-, Ionen- und pH-Homöostase im retinalen Gewebe (Reichenbach 1999). Außerdem sind Müllerzellen an der Induktion der Blut-Retina-Schranke (Tout 1993), der Kontrolle der Angiogenese und der Regulation des retinalen Blutflusses beteiligt (Bringmann et al. 2006).

Neben ihrer Bedeutung für die physiologischen Funktionen der Netzhaut spielen Müllerzellen auch bei pathologischen Prozessen eine wichtige Rolle, zum Beispiel bei der Entwicklung des Netzhautödems. Dieses ist eine Komplikation verschiedener Erkrankungen traumatischer, vaskulärer oder inflammatorischer Art. Bei einem Ödem

handelt es sich um eine pathologische Ansammlung von Flüssigkeit im Gewebe. Zur Pathogenese des Hirnödems gibt es seit 1967 die Einteilung von Klatzo, die zwei verschiedene Mechanismen für die Entstehung eines Ödems verantwortlich macht (Klatzo 1967). Unterschieden wird dabei zwischen einem vasogenen, extrazellulären Ödem, das durch Öffnung der Blut-Hirn/Retina-Schranke entsteht, und einem zytotoxischen, intrazellulären Ödem, was durch die erhöhte Aufnahme osmotisch aktiver Substanzen in die Zelle mit folgender Zellschwellung gekennzeichnet ist (Unterberg 2004, Kimelberg 1990). Ein sich nach Ischämie und Trauma entwickelndes Hirnödem ist primär zytotoxisch durch Astrozytenschwellung vermittelt (Kimelberg, 2005). Die osmotische Schwellung ist auch ein charakteristisches Merkmal retinaler Müllerzellen in Modellen ischämischer, entzündlicher und diabetischer Retinopathie (Pannicke et al., 2004, 2005a, 2005b, 2006).

Eine gestörte Müllerzellfunktion und ein vaskuläres Leck gelten als die Hauptpathogenitätsfaktoren des Makulaödems (Reichenbach et al. 2007). Bei einem Makulaödem kommt es zu einer Flüssigkeitsansammlung im Bereich der Makula, der Stelle des schärfsten Sehens, was zur Verschlechterung der Sehschärfe führt. Das Makulaödem kommt im Rahmen verschiedener Augenerkrankungen vor, wie z. B. bei Infektionen, Traumata, Tumoren, Entzündungen oder vaskulären Erkrankungen oder auch bei diabetischer Retinopathie (Bringmann et al. 2004). Es ist bemerkenswert, dass diabetisches Makulaödem und diabetische Vitreoretinopathie die häufigste Ursache für Erblindung in der arbeitsfähigen Bevölkerung in den westlichen Industrienationen sind (Hörle et al. 2002). Die Inzidenz diabetesbedingter Erblindungen in westlichen Industrieländern liegt bei ca. 1,5 – 2 je 100 000 Einwohner (Hörle et al. 2002).

Allerdings ist bekannt, dass es physiologische Mechanismen gibt, die einer Zellschwellung entgegenwirken. So wurde für die Regulation des Zellvolumens einmal eine regulatorische Volumenabnahme aber auch eine regulatorische Volumenzunahme beschrieben (Lang et al. 1998). Bei der regulatorischen Volumenabnahme wird ein Verlust von Kalium- und / oder Chlorid-Ionen als Ergebnis einer Aktivierung verschiedener Kalium- oder Chloridkanäle oder von Kalium- und Chloridkotransportern erreicht (McManus 1995). Weiterhin sind auch Genexpression, Stoffwechsel und organische Osmolyte für regulatorische Volumenabnahme von Bedeutung (Waldegger et al. 1998). Auch in glialen Zellen wurden derartige Mechanismen beschrieben (Kimelberg 1987, Ernest et al. 2005).

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war es, Möglichkeiten der Beeinflussung der Volumenregulation der Müllerzellen zu untersuchen. Dies würde einen wesentlichen Fortschritt in der Behandlung des Hirnödems oder des Makulaödems bedeuten, da hier die bisherige Therapie auf einer Entzündungshemmung durch Glukokortikoide oder unspezifischen diuretischen Maßnahmen basiert. Weiterhin besteht für die diabetische Retinopathie als ödemassoziierte Krankheit die Behandlung hauptsächlich aus panretinaler Photokoagulation, was Gebiete der Retina zerstört, aber zentralen Gesichtsfeldverlust verhindert (Aiello 2005) und der intravitrealen Gabe des Glukokortikoids Triamcinolon (Jermak et al. 2007).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung des Erythropoietins (EPO) auf das Schwellungsverhalten von Müllerzellen untersucht. EPO ist ein Mitglied der Zytokin-1-Superfamilie. Es ist hauptsächlich für seine erythropoesefördernde Wirkung bekannt und wird von den interstitiellen Zellen der Niere als Antwort auf hypoxische Stimulation gebildet (Lacombe, Mayeux 1998). Neben seiner Bedeutung für die Erythrozytenentwicklung wurden in den letzten Jahren weitere Wirkungen untersucht, die zu Entwicklung, Schutz, Reparatur und Homöostase des Nervensystems beitragen (Genc et al. 2003). Im ZNS können Gliazellen, Neuronen und Endothelzellen EPO produzieren und verfügen darüber hinaus über EPO-Rezeptoren (Marti 2004, Bernaudin et al. 2000, Juul et al. 1998). In der adulten Retina scheinen Müllerzellen die wichtigsten Produzenten von EPO zu sein (Fu et al. 2008), wohingegen der EPO-Rezeptor auf den Somata nahezu aller retinalen Zelltypen zu finden ist (Munro et al. 2009). Eine verstärkte Expression konnte in der Ganglienzellschicht (Weishaupt et al. 2004) und in der inneren Körnerschicht (Zhu et al. 2008, Fu et al. 2008) nachgewiesen werden.

Die Verteilung von EPO und seinem Rezeptor ändert sich unter pathologischen Bedingungen. Nach Ischämie ist der EPO-Rezeptor sowohl in der Retina (Junk et al. 2002) als auch im Gehirn (Sirén, Ehrenreich 2001) vermehrt vorhanden. Für Astrozyten konnte gezeigt werden, dass Hypoxie eine erhöhte EPO-Produktion auslöst (Liu et al. 2006). Bei der diabetischen Retinopathie ist sowohl der EPO-Gehalt der Netzhaut (García-Ramírez 2008), als auch die EPO-Konzentration in der Glaskörperflüssigkeit erhöht (Inomata et al. 2004, Katsura et al. 2005, Hernández et al. 2006, Takagi et al. 2007, Garci-Arumi et al. 2008). Diese pathologiebedingten Veränderungen werden jedoch unterschiedlich bewertet: einerseits wird EPO aufgrund seiner angiogenetischen Eigenschaften als pathogener Faktor angesehen (Watanabe 2005, Takagi et al. 2007),

andererseits wird hinter der Hochregulation des EPO/EPO-Rezeptorsystems ein neuroprotektiver Mechanismus vermutet (Junk et al. 2002; Marti 2004; Brines, Cerami 2005)

1.1 Zielstellung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand primär darin zu untersuchen, ob EPO die Müllerzellschwellung unter pathologischen Bedingungen inhibiert und welcher Signalweg einem eventuellen Effekt zugrunde liegt. Dies würde eine neue neuroprotektive Eigenschaft des EPOs zeigen. In Zukunft könnten sich dadurch Möglichkeiten für eine spezifischere Therapie von Ödemen, in Hirn und Netzhaut eröffnen.

2 Material und Methoden

2.1 Allgemeines

2.1.1 Tiere

Für die Versuche wurden Long-Evans-Ratten (250-350 g) beiderlei Geschlechts im Alter von 4-9 Monaten aus dem Medizinisch-Experimentellen Zentrum der Medizinischen Fakultät verwendet. Sie hatten freien Zugang zu Wasser und Futter und wurden in einem 12 h-Licht- 12 h-Dunkelrhythmus gehalten. Die Ratten wurden mit einer erhöhten CO₂-Konzentration in der Atemluft getötet. Diabetes wurde bei 12 Wochen alten Ratten mit einer einmaligen Streptozotocininjektion (65 mg/kg Körpergewicht) induziert. Die Blutglukose wurde regelmäßig mit dem Blutzuckermessgerät Accu-Chek der Firma Roche Diagnostics (Mannheim, Germany) kontrolliert. Kurz vor der Retinaentnahme war das Glukoselevel $5,4 \pm 0,4$ mM bei unbehandelten Tieren und $31,0 \pm 3,0$ mM bei Streptozotocin behandelten Tieren (jeweils n=3). Bei Blutglukosewerten über 33,3 mM wurde Insulin (Lantus, Aventis Pharma, Bad Soden, Deutschland; 2 Units 3 Mal pro Woche) subkutan injiziert, um Gewichtsverlust aber nicht die Hyperglykämie zu verhindern. Die Tiere wurden nach 2 bis 4 Monaten getötet. Die Versuche fanden gemäß den Richtlinien des Deutschen Tierschutzgesetzes auf Basis eines bewilligten Tierschutzantrages statt.

2.1.2 Retinapräparation

Nach der Eukleation beider Augäpfel der getöteten Ratte wurden diese mit einer Schere entlang der Ora serrata aufgeschnitten, Linse und Glaskörper entnommen und die Retina in Extrazellulärlösung mit einer gebogenen Pinzette vom Pigmentepithel abgestreift.

2.1.3 Mikroskop

Ein konfokales Laser-Scanning-Mikroskop LSM 510 Meta (Zeiss, Oberkochen, BRD) mit dazugehöriger Bildanalyse-Software wurde zur Darstellung der Müllerzellen benutzt. Der Vorteil eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops gegenüber einem konventionellen Lichtmikroskop besteht darin, dass mittels einer Lochblende Fluoreszenzlicht zurückgehalten wird, das aus Bereichen ober- bzw. unterhalb der Fokusebene stammt.

Für die Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes Mitotracker Orange (Molecular Probes, Eugene, USA) wurde ein Helium-Neon-Laser der Wellenlänge 543 nm verwendet. Die Emissionen wurden unter Verwendung eines 560-nm-Langpassfilters aufgezeichnet. Das Präparat wurde mittels eines Wasserimmersionsobjektivs (Achroplan 40x/ 0,75, Zeiss, Oberkochen, BRD) untersucht. Der jeweils untersuchte Bildausschnitt hatte eine Größe von 57,6 x 57,6 μm .

Für Markierungen mit Cy3-gekoppelten Antikörpern wurde ein Helium-Neon-Laser (Anregung bei 543nm, Bandpassfilter 560-615-nm) verwendet. Zur Darstellung von Markierungen mit Cy2-gekoppelten Antikörpern wurde ein Argon/Krypton-Laser (Anregung bei 488 nm, Bandpassfilter 505-550 nm) genutzt, sowie zur Darstellung der Zellkerne mit dem Farbstoff Hoechst 33258 (Invitrogen; H3569) ein UV-Laser (Anregung bei 351/364 nm, variabler Filter).

2.2 Schwellungsexperimente

2.2.1 Fluoreszenzfarbstoff

Für die Darstellung der Müllerzellen im vitalen Retinaschnitt mittels Laser-Scanning-Mikroskopie wurde der Vitalfarbstoff Mitotracker Orange (Molecular Probes, Eugene, USA) verwendet. Dieser wird selektiv von Müllerzellen aufgenommen, während neuronale Zellen größtenteils ungefärbt bleiben (Uckermann et al. 2004) Zunächst wurde eine Stammlösung von 1 mM in Dimethylsulfoxid (DMSO; Sigma, Steinheim, BRD) hergestellt. Mit PBS (phosphatgepufferte Salzlösung von Biochrom AG, Berlin, BRD) wurde diese auf 10 μM verdünnt. Im Experiment wurden 200 μl der 10 μM Farbstofflösung in 2 ml Flüssigkeit der Perfusionskammer gegeben und die Schnitte darin 5 min vorinkubiert (Uckermann et al. 2004). Die Endkonzentration des Mitotrackers lag somit bei 1 μM .

2.2.2 Perfusionslösungen

Für Präparation und Perfusion des retinalen Gewebes wurden folgende Lösungen benutzt:

- normotone Extrazellulärlösung (EZL)
- hypotone Extrazellulärlösung (EZL60)
- EZL mit 1 mM BaCl_2 (Ba)
- EZL60 mit 1 mM BaCl_2 (Ba60)

Die **EZL** wurde vor jedem Versuch frisch angesetzt und enthielt:

NaCl	136 mM	(Carl Roth, Karlsruhe, BRD)
KCl	3 mM	(Carl Roth, Karlsruhe, BRD)
MgCl ₂	1 mM	(Sigma, Steinheim, BRD)
CaCl ₂	2 mM	(Merck, Darmstadt, BRD)
HEPES(N-2-hydroxyethyl- piperazin- N'-2-ethansulfonsäure)	10 mM	(Carl Roth, Karlsruhe, BRD),
Glucose	11 mM	(Merck, Darmstadt, BRD)

Die Lösung wurde mit Tris-(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS-Base, Carl Roth, Karlsruhe, BRD) auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt.

Die **EZL60** wurde durch eine Verdünnung der EZL auf 60 Volumen% mit A. bidest. hergestellt.

2.2.3 Erythropoietin

Das Schwellungsverhalten der Müllerzellen wurde mit rattenspezifischem Erythropoietin (Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD; A-8208) untersucht. Das Erythropoietin wurde in A. bidest. gelöst, so dass eine Stammlösung der Konzentration von 1 µM entstand. Diese wurde mit der jeweiligen hypotonen Lösung auf 1 nM verdünnt.

2.2.4 Applizierte Substanzen

Zur Untersuchung der durch EPO aktivierten Signalkaskade wurden die in Tab.1 aufgeführten Substanzen verwendet.

Tab. 1: Angaben zu den verwendeten Substanzen

Bezeichnung, verwendete Konzentration, Eigenschaft, Lösungsmittel, Applikationsschema (siehe Abb. 3), Inkubationszeit und Bezugsquelle der verwendeten Substanzen (PKC: Proteinkinase C; PKA: Proteinkinase A; mGluR: metabotroper Glutamat-Rezeptor; PLC: Phospholipase C; NaOH: Natriumhydroxid, MAP-kinase: Mitose-assoziierte Proteinkinase, Src: Sarcoma cellular):

Substanz	Konzentration	Eigenschaft	Gelöst in: (Stammlösung)	Applikation (siehe Abb. 3)	Inkubation	Firma, Bestellnummer
AG 1478 (N-(3-Chlorophenyl)-6,7-dimethoxy-4-chinazolinanin hydrochlorid)	500 nM	Selektiver Inhibitor der epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptorkinase	DMSO	B	20 min	LC Laboratories, Woburn, MA 01801, T-7310
AG 490 ((E)-2-Cyano-3-(3,4-dihydrophenyl)-N-(phenylmethyl)-2-	100 µM	Inhibitor der Januskinase 2	DMSO	B	20 min	Tocris, Cookson Ltd., Bristol, UK; 0414

Material und Methoden

propenamid)						
Anti-VEGF neutralisierender Antikörper	1 µg/ml	neutralisiert die biologische Wirksamkeit von VEGF	PBS	B	45 min	R&D Systems AB-293-NA
AOPCP (Adenosin 5'-(α,β-methylen)-diphosphat)	200 µM	selektiver Antagonist der Ekto-5'-Nucleotidase	A. bidest.	B	20 min	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD; M-3763
Arachidonsäure (5,8,11,14-Eicosatetraensäure)	10 µM	Entzündungsmediator, inhibiert u.a. die Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	Methanol	C	-	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD; 10931
ARL 67156 (6-N,N-Diethyl- β-γ-dibromomethylen-D-adenosin-5'-triphosphat)	50 µM	selektiver Antagonist der Ekto-ATPase	A. bidest.	B	20 min	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD; A-265
Bafilomycin A1	100 nM	spezifischer Inhibitor der vakuolischen ATPase	DMSO	B	45 min 37°C	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD; B1793
BAPTA-AM (1,2-Bis-(2-amino-phenoxy)ethan-N,N,N',N'-tetraessigsäure-azetoxymethylester)	100 µM	selektiver intrazellulärer Calciumchelator	DMSO	B	30 min	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD A-1076
Cadmiumchlorid	100 µM	Ca ²⁺ -Kanalblocker	A. dest.	B	15 min	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD 202908
Clofilium (4-Chloro-N,N-diethyl-N-heptylbenzenbutan-aminiumtosylat)	10 µM	Kaliumkanalblocker	A.dest.	B	15 min	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD C2365
CPCCOEt (7-Hydroxyimino-cyclopropan[b]chromen-1α-carboxylsäure-ethylester)	20 µM	potenter, selektiver, nicht kompetitiver mGluR ₁ Antagonist	DMSO	B	15 min	Tocris, Cookson Ltd., Bristol, UK; 1028
Chinin	200 µM	Kaliumkanalblocker		B	15 min	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD; 145904
DPCPX (8-Zyklopentyl-1,3-dipropylxanthin)	100 nM	selektiver A1-Adenosin-Rezeptor-Antagonist	DMSO	B	15 min	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD C-101
EGLU ((S)-α-Ethylglutamat)	200 µM	selektiver Blocker der mGluR Gruppe II	NaOH	B	15 min	Tocris, Cookson Ltd., Bristol, UK; 0971
Löslicher EPO-Rezeptor	100 ng/ml	Bindung gelösten Erythropoietins	PBS	B	45 min	R&D Systems, 1390-ER
Flufenamic Acid (N-(3-[Trifluoromethyl]phenyl)-anthranilsäure)	500 µM	nicht selektiver Kationenkanalantagonist	Ethanol	B	15 min	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD; F9005

Material und Methoden

Gö 6976 (12-(2-Zyanoethyl)- 6,7,12,13-tetrahydro- 13-methyl-5-oxo-5h- indolo(2,3a)pyrrolo- (3,4-c)-carbazol)	1 µM	selektiver Antagonist der Ca^{2+} -abhängigen Subtypen der PKC	DMSO	B	20 min	Calbiochem, Darmstadt, BRD; Cat. 365250
H₂O₂	50 µM	erzeugt oxidativen Stress	-	C	-	
H-89 (N-[2-(p- Bromocinnamylamino) ethyl]-5-iso- chinolinsulfonamid dihydrochlorid)	1 µM	selektiver, potenter Inhibitor der cAMP- abhängigen Proteinkinase	H ₂ O	B	15 min	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD B1427
LY 294002 (2-(4-Morpholinyl)-8- phenyl-1(4H)- benzopyran-4-on hydrochlorid)	5 µM	spezifischer zellpermeabler Phosphatidylinositol 3-kinase-Inhibitor	DMSO	B	15 min	Calbiochem, Darmstadt, BRD; Cat. 440204
LY 341495 ((2S)-2-Amino-2- ((1S,2S)-2- karboxyzykloprop-1- yl)-3-(xanth-9- yl)propane-1-carboxylic acid)	100 µM	selektiver Antagonist der m-Glu-R Gruppe II	DMSO	B	15 min	Tocris Cookson Ltd., Bristol, UK; 1209
MPEP (6-Methyl-2-(phenyl- ethynyl)pyridine)	10 µM	selektiver Antagonist des mGluR Gruppe I/5	DMSO	B	15 min	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD; M-5435
MRS 2179 (2'-Deoxy-N ⁶ - methyladenosin 3',5'- diphosphat diammoniumsalz)	30 µM	kompetetiver P2Y ₁ - Rezeptorantagonist	DMSO	B	15 min	Tocris Cookson Ltd., Bristol, UK; 0900
NBTI (S-(4-Nitrobenzyl)-6- thioinosin)	10 µM	selektiver Antagonist des Nukleosid- Transporters	DMSO	B	15 min	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD; N-2255
NPPB (5-Nitro-2-(3- phenylpropylamino) benzoessäure)	100 µM	potenter Cl ⁻ - Kanalblocker	DMSO	B	15 min	Calbiochem, Darmstadt, BRD; Cat. 484100
PD 98059 (2-(2-Amino-3- methoxyphenyl)-4H- 1-benzopyran-4-on)	20 µM	MAP- Kinaseninhibitor	DMSO	B	20 min	Tocris Cookson Ltd., Bristol, UK; 0900
PGE2 Prostaglandin E ₂ ((5Z,11α,13E,15S)- 11,15-Dihydroxy-9- oxoprostanoic acid)	30 nM	inhibiert die Na ⁺ /K ⁺ - ATPase	Ethanol	C	-	Calbiochem, Darmstadt, BRD; Cat. 538904
PP1- Analog (Ethyl/ Methyl-3,4- dephostatin) 4-Amino-1-tert-butyl- 3-(1'-naphthyl- methyl)pyrazolo [3,4-d]pyrimidin)	10 µM	selektiver Inhibitor der Tyrosin- phosphatase 1B und SHPTP-1	DMSO	B	20 min	Calbiochem, Darmstadt, BRD; Cat. 529579

SU 1498 (<i>(E)</i> -N-(3''-Phenylpropyl)- α -cyano-3',5'-diisopropyl-4'-hydroxycinnamid)	10 μ M	potenter und selektiver Inhibitor der VEGF-Rezeptor-Kinase	DMSO	B	15 min	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD; T4192
SU 6656 (2,3-Dihydro-N,N-dimethyl-2-oxo-3-[(4,5,6,7-tetrahydro-1H-indol-2-yl)methylen]-1H-indol-5-sulfonamid)	10 μ M	selektiver Src-Kinase-Inhibitor	DMSO	B	15 min	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD; S9692
TTX (Tetrodotoxin)	1 μ M	reversibler Blocker spannungsgesteuerter Na ⁺ -Kanäle	A. dest.	B	15 min	Tocris, Cookson Ltd., Bristol, UK
U 73122 (1-(6-((17 β -3-Methoxyestra-1,3,5(10)-trien-17-yl)amino) hexyl)-1H-pyrrol-2,5-dion)	10 μ M	selektiver Antagonist der PLC	DMSO	B	15 min	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD; U-6756

2.2.5 Retinapräparation und Schnittherstellung

Nach Präparation der Retina wie im Punkt 2.1.2 beschrieben, wurde diese halbiert und auf einem Membranfilter (Schleicher & Schuell, Dassel, BRD) ausgebreitet, so dass sich die Photorezeptorseite zum Filter hin orientierte. Alle Arbeitsschritte fanden in EZL zum Schutz vor Austrocknung statt.

Anschließend wurde die auf den Filter aufgebrachte Retina mit einer Schneidevorrichtung in 1 mm dicke Schnitte geschnitten.

2.2.6 Messanordnung

Die Messkammer bestand aus einem von Plexiglas umgebenen Objektträger und zwei auf dem Boden befestigten Plexiglaswürfeln, die Schlitz in der Mitte hatten. Diese dienten der Befestigung des Membranfilters mit der Retina.

Die Perfusion des Schnittes in der Kammer erfolgte kontinuierlich nach in Abb. 2 gezeigtem Aufbau.

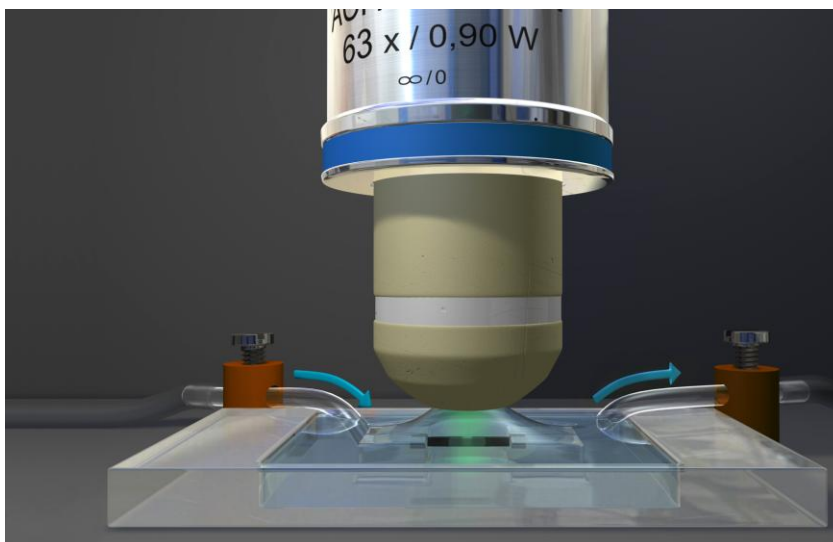


Abbildung 2:
Messkammer mit
Immersionsobjektiv
unter Perfusion.

2.2.7 Versuchsschema

Das Ziel der Arbeit war es, zu untersuchen, inwieweit Müllerzellen ihr Volumen unter osmotischem Stress regulieren können und welchen Einfluss Erythropoietin auf diese Regulation hat. In diesem Sinne wurden für jeden Versuch sowohl Kontrollen in EZL60, bei denen die Zellen nicht schwollen, als auch in Ba60, bei denen die Zellen schwollen, durchgeführt (siehe Abb. 3A).

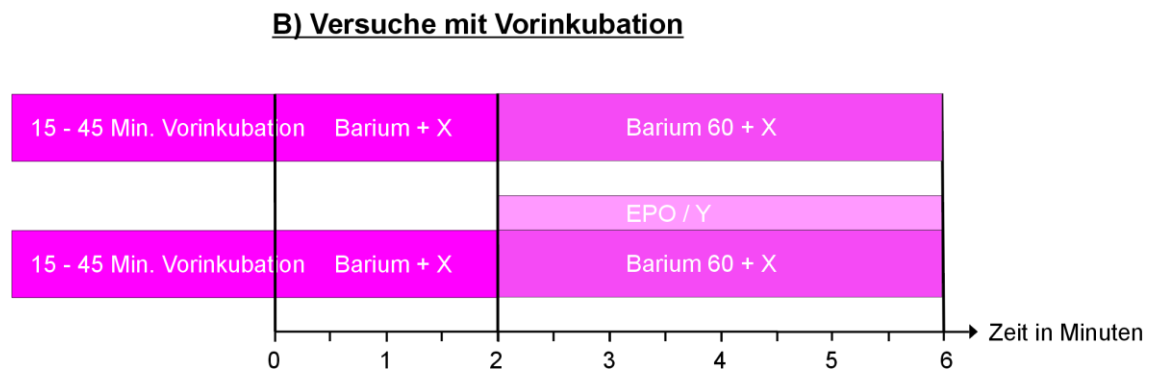
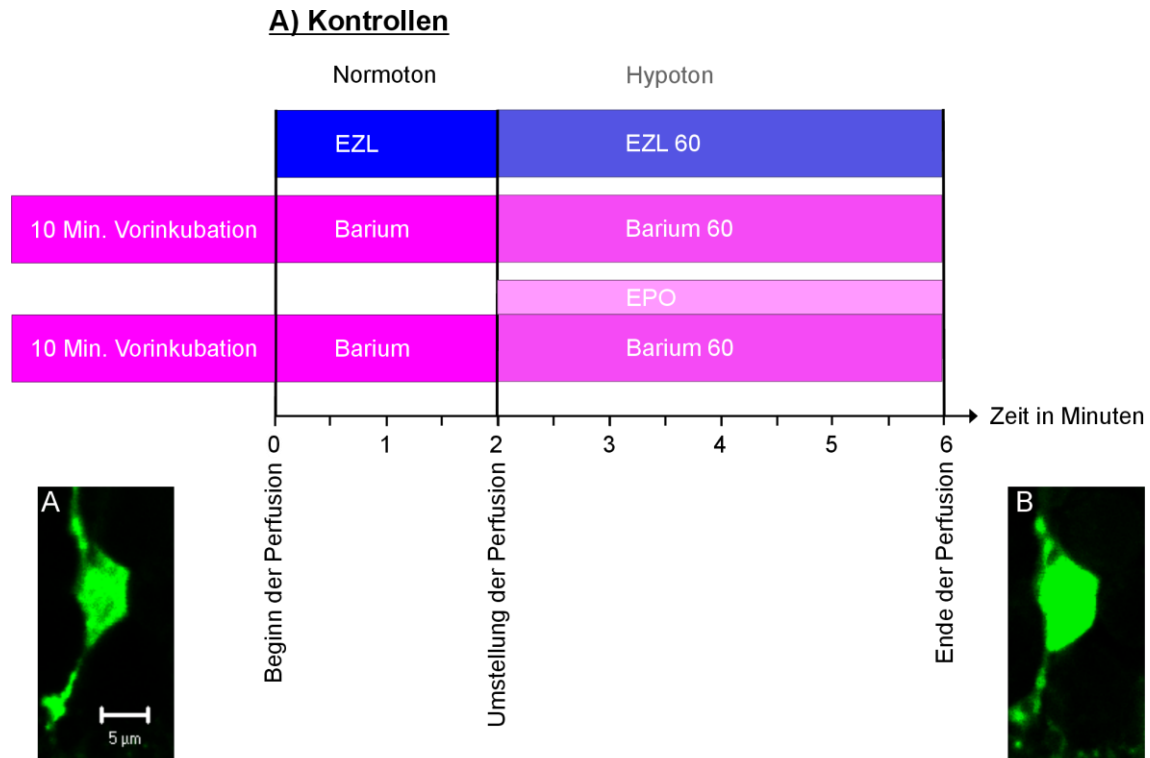
Die getesteten Substanzen wurden anhand eines festen Schemas mit der Perfusionslösung zugeführt. Einige wurden nur der hypotonen Lösung zugesetzt (Abb. 3C). Andere befanden sich außerdem bereits in der normotonen Ba- Lösung (Abb. 3B). Die Schnitte wurden darin substanzabhängig 15-45 min vorinkubiert.

2.2.8 Versuchsdurchführung

Das Retinapräparat wurde in die oben beschriebene, mit Perfusionslösung gefüllte Messkammer gegeben und Mitotracker appliziert. Zur ersten Orientierung waren die Retinaschichten im Durchlichtmikroskop bei 40facher Vergrößerung gut abgrenzbar. Danach konnten die fluoreszenzgefärbten Müllerzellsomata mittels LSM in der INL dargestellt werden (Uckermann et al. 2004).

Schließlich wurde die Perfusion nach dem jeweiligen Versuchsschema gestartet und die Aufzeichnung der Müllerzellsomata mittels des LSM mit einer Geschwindigkeit von einem Bild pro Sekunde begonnen. Um das maximale Somaareal für die spätere Ausmessung zu erhalten, wurde während des Experiments fortlaufend durch den Retinaschnitt fokussiert. Das Somaareal wurde zu Beginn des Versuchs in normotoner Lösung zweimal im Abstand von 60 s gemessen, woraus sich der Kontrollwert von 100% ergibt. Danach wurden die Schnitte für 240 s mit hypotoner Lösung perfundiert und im Anschluss daran das Somaareal erneut gemessen.

Für die Darstellung der Zeitabhängigkeit der Schwellung wurde 450 s lang alle 30 s durch den gesamten Schnitt fokussiert und das maximale Somaareal gemessen.



C) Versuche ohne Vorinkubation

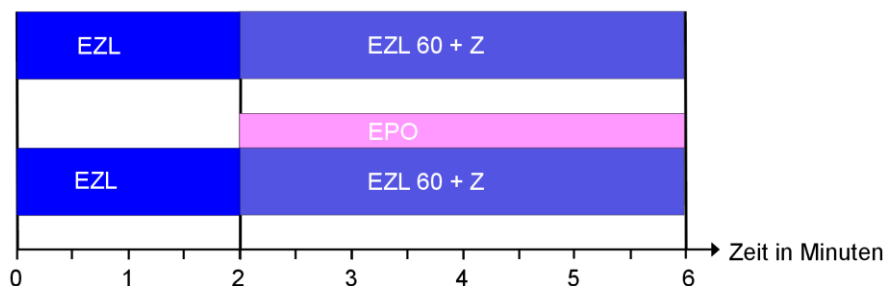


Abbildung 3: Ablaufschemata der Versuche. A) Folgende Kontrollmessungen wurden bei jedem Versuch mitgeführt: nicht schwellende Kontrolle in EZL/EZL60, schwellende Kontrolle in Ba/Ba60, nicht schwellende Kontrolle in Ba/Ba60+EPO. B) Ein Teil der applizierten Substanzen (X) musste 15- 45 min. vorinkubiert werden (siehe Tab. 1) und wurden dann auch mit der hypotonen Lösung zugeführt. Weiterhin wurden EPO oder eine andere schwellungsinhibierende Substanz (Y) zugesetzt. C) Andere Substanzen (Z) wurden akut der hypotonen Lösung beigelegt.

Die Bilder unter A stellen ein Müllerzellsoma vor (A) und nach (B) der Perfusion mit hypotoner Bariumlösung dar (schwellende Kontrolle). Die Somafläche ist vergrößert und die Zelle stellt sich abgerundet dar.

2.2.9 Ausmessen der Müllerzellquerschnittsflächen

Nach der Durchführung des Versuches wurden die Querschnittsflächen der mit Mitotracker-Orange gefärbten Müllerzellsomata mit der Bildanalyse-Software des LSM ausgemessen. Die größten Querschnittsflächen der Müllerzellsomata wurden manuell umrandet. Mit Hilfe des Zeiss-Bildanalyseprogramms erhält man Werte für diese Querschnittsflächen zu den oben angegebenen Zeitpunkten.

2.2.10 Auswertung der Messergebnisse und statistische Analyse

Die statistische Auswertung erfolgte im Statistikprogramm Graph Pad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Der Mittelwert für die Fläche unter normotonen Bedingungen wurde aus den nach 0 und 60 s nach Beginn der Aufnahmen gemessenen Werten ermittelt. Dieser Wert wurde für jede Zelle auf 100% gesetzt, wodurch Schwankungen der Zellgrößen zwischen den Zellen nicht in die Auswertung eingehen. Weiterhin wurde die Fläche nochmals nach 240 s ab Beginn der hypotonen Perfusion gemessen und dieser Wert dann in Prozent des Kontrollwertes angegeben. Ein Wert von 100% bedeutet also, dass keine Veränderung der Müllerzellsomafläche stattfand, wie das bei den Kontrollversuchen in EZL60 zu beobachten war (siehe Abb. 6 Ergebnisse).

Die so erhaltenen Werte wurden von allen in dieser Gruppe gemessenen Zellen zusammengefügt, so dass Mittelwerte (MW) \pm SEM (Standardfehler des Mittelwertes) berechnet werden konnten, wobei n der Anzahl der untersuchten Zellen entspricht.

Durch den Mann-Whitney-Test (zweiseitig) wurden signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von mindestens $P < 0,05$ festgestellt.

Signifikante Unterschiede sind in allen Abbildungen dieser Arbeit wie folgt gekennzeichnet.

Signifikante Unterschiede gegenüber der:	$P < 0,001$	$P < 0,01$	$P < 0,05$
- EZL60 (d. h. Zellschwellung)	ooo	oo	o
- Ba60 (d.h. keine Zellschwellung/ Schwellungshemmung)	***	**	*
- hypotonen Ba^{2+} -Lösung mit 1nM EPO (d.h. Aufhebung des EPO-Effektes = Zellschwellung)	+++	++	+

2.3 Immunfluoreszenz

2.3.1 Darstellung von Erythropoietinrezeptoren in einer Dreifachfärbung im Retinaschnitt

In diesem Experiment wurde der Kernfarbstoff Hoechst 33258 (Invitrogen; H3569), ein Glutaminsynthetaseantikörper (Chemicon, MAB302) und ein Erythropoietinrezeptorantikörper (Santa Cruz) zur Dreifachfärbung kombiniert. Die Retina wurde wie unter 2.1.2 beschrieben präpariert. Dies fand in einer mit PBS gefüllten Petrischale statt. Der Ablauf der Färbungen wird im folgenden Protokoll beschrieben:

- Fixation in 4%igem Paraformaldehyd für 1,5 h
- 3 x 30 Minuten waschen in PBS
- Einbettung in 3%ige Agarose
- Herstellung 70 µm dicker Schnitte mit dem Vibratom
- Waschen in 0,5% TritonX100, 1,5% DMSO und PBS für 30 Min.
- Inkubation in einer Blockerlösung aus 10%igem normalen Ziegenserum, 0,5% TritonX100, 1,5% DMSO und PBS für 1h
- Inkubation mit Maus-anti-Glutaminsynthetase- und Kaninchen-anti-Erythropoietinrezeptor- Antikörper über Nacht bei 4°C
- 3 x Waschen mit 0,5% TritonX100, 1,5% DMSO und PBS, Dauer: 4 h
- Inkubation mit Ziege-anti-Kaninchen-Cy3 / Ziege-anti-Maus-Cy2 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) über Nacht bei 4° C
- 3 x Waschen mit 0,5% TritonX100, 1,5% DMSO und PBS, Dauer: 3 h
- Inkubation mit 0,1%igem Kernfarbstoff Hoechst 33258 für 30 min.
- 3 x Waschen mit PBS 30 Min.
- 1 x Waschen mit Aqua bidest.
- Eindecken mit Aqua Polymount (Polyscience, Eppelheim, BRD)

2.3.2 Darstellung von Erythropoietinrezeptoren an isolierten Müllerzellen

Für diese Färbung wurden ein Glutaminsynthetaseantikörper und ein Erythropoietinrezeptorantikörper zur Zweifachfärbung verwendet. Die Retina wurde wie unter 2.1.2 beschrieben präpariert und danach für 30 Minuten bei 37°C in PBS mit 0,4 mg/ml Papain (Roche, Mannheim, BRD) gegeben.

Die Fixierung, Isolierung und Färbung wird im folgenden Protokoll beschrieben:

- Waschen mit PBS zur Entfernung des Papains
- DNase- Behandlung (DNase I, Sigma, 200 U/ml)
- Fixierung mit 4% Paraformaldehyd für 10 Minuten
- Waschen mit PBS
- Trituration des Gewebes zur Vereinzelung der Zellen
- Ausstrich von 40 µl der Zellsuspension auf jeweils einen beschichteten Objektträger (Superfrost plus, Menzel, Braunschweig, BRD)
- Blockierung und Permeabilisation mit 5%igem normalen Ziegenserum 0,5% TritonX100, 1,5% DMSO und PBS für 30 Minuten
- Inkubation mit Kaninchen- anti- EPO-Rezeptor-Antikörper und Maus-anti-Glutaminsynthetase- Antikörper für 2 h bei Raumtemperatur
- Waschen mit 1%igem Rinderserumalbumin
- Zugabe der Sekundär-Antikörper Ziege-anti-Kaninchen-Cy3 und Ziege-anti-Maus-Cy2 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.)
- 3 x Waschen mit PBS 30 Min.
- 1 x Waschen mit Aqua bidest.
- Eindecken mit Aqua Polymount

3 Ergebnisse

3.1 Die Müllerzellschwellung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Schwellungsverhalten von Müllerzellen bei osmotischem Stress untersucht. Wie von Pannicke et al. (2004, 2006) beschrieben, reagieren Müllerzellen in postischämischen Netzhäuten und Netzhäuten diabetischer Ratten auf ein Absinken der extrazellulären Ionenkonzentration mit einer Größenzunahme ihrer Somata, was als Zellschwellung interpretiert wird. Weitere Experimente zeigten, dass auch Müllerzellen in Kontrollnetzhäuten in einer hypotonen Lösung mit 1 mM BaCl_2 schwellen (Pannicke et al. 2004). Ba^{2+} -Ionen blockieren konzentrationsabhängig einen großen Teil der K^+ -Leitfähigkeit der Müllerzelle. Mit 1 mM Ba^{2+} sind die einwärts rektifizierenden K^+ - (Kir) Kanäle vollständig blockierbar; spannungsabhängige (auswärts rektifizierende) K^+ -Ströme sind deutlich reduziert (Newman 1989, Pannicke et al. 2005). In Abb. 4 ist ersichtlich, dass bei einer zehnminütigen Vorinkubation mit Ba^{2+} (1 mM) die relative Somafläche der Müllerzellen in hypotonem Milieu über einen Perfusionszeitraum von 300 s um 10-20%

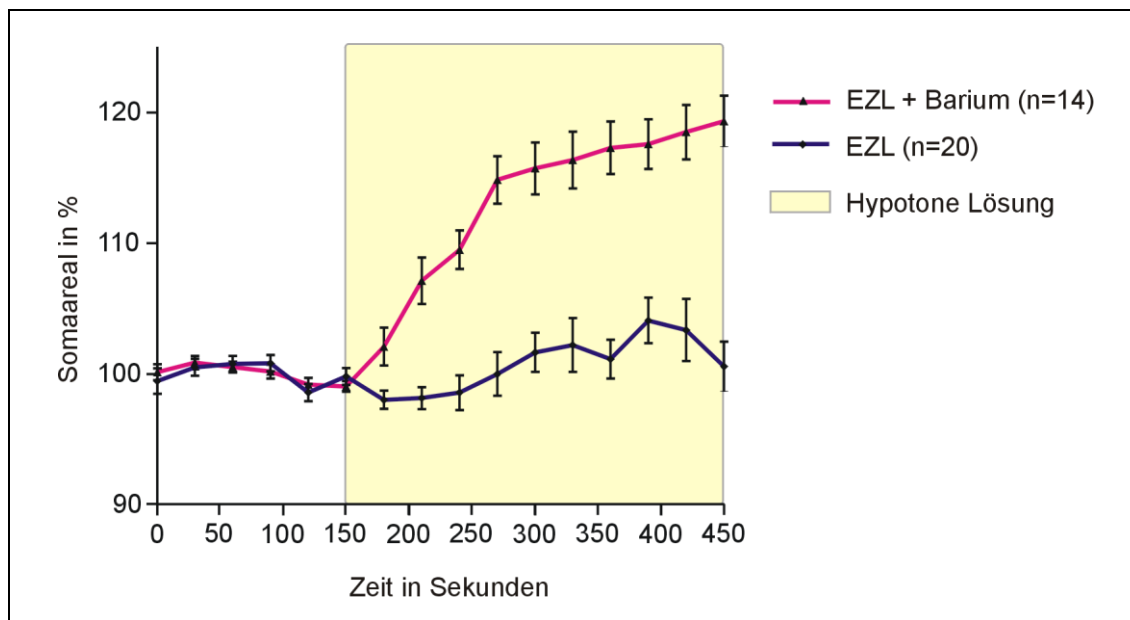


Abbildung 4: Zeitverlauf der Müllerzellschwellung in EZL60 mit und ohne Ba^{2+} . Unter hypotonen Bedingungen (60% Osmolarität der EZL) reagierten die Müllerzellen nur dann mit einer Zunahme ihrer Somafläche, wenn zuvor die K^+ -Kanäle mit Ba^{2+} (roter Graph: $\text{EZL}+\text{Ba}^{2+}$) blockiert wurden, wobei ein besonders starker Anstieg in den ersten 120 s erfolgte. Die relative Müllerzellsomafläche nahm dabei um 10-20% zu. Unter Kontrollbedingungen, d.h. in hypotoner Lösung ohne Bariumzugabe (blauer Graph: EZL) ließ sich keine Zunahme der Müllerzellsomafläche beobachten. Es ergab sich ein signifikanter Unterschied ($P < 0,001$) zwischen der relativen Somafläche der Müllerzellen in hypotoner Ba^{2+} -Lösung gegenüber der Somafläche von Müllerzellen in hypotoner EZL. Dargestellt sind die MW \pm SEM mehrerer Zellen (n).

zunahm. Als Kontrolle diente die Perfusion mit einer hypotonen EZL ohne Ba^{2+} , bei der sich keine signifikante Zunahme der relativen Müllerzellsomafläche feststellen ließ.

3.2 Der Einfluss von EPO auf die Müllerzellschwellung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von EPO auf die unter 3.1 beschriebene Müllerzellschwellung untersucht. EPO wurde in einer Konzentration von 1 nM mit der hypotonen Lösung appliziert. Es konnte dabei die Ba^{2+} -induzierte Schwellung der Müllerzellsomata über einen Zeitraum von 300 s verhindern (Abb. 5).

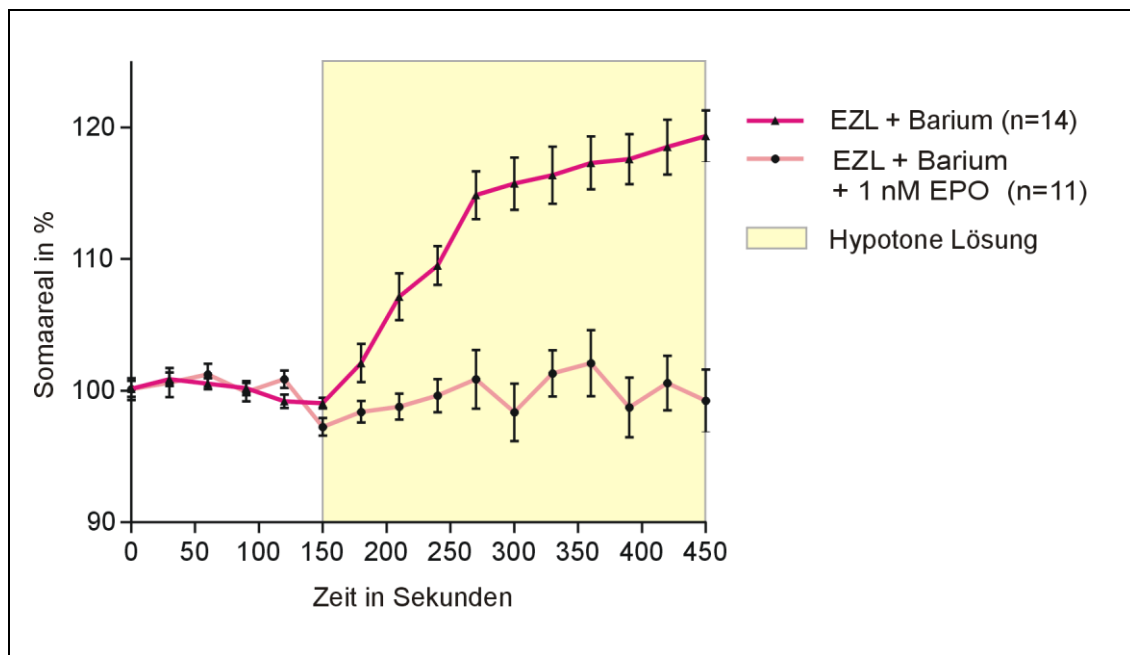


Abbildung 5: Zeitverlauf der Müllerzellschwellung bei Applikation von EPO (1 nM) in Ba^{2+} -haltiger Lösung. Während die Zellen bei Perfusion mit hypotoner Bariumlösung über einen Zeitraum von 300 s mit einer Zunahme ihrer Somafläche bis zu 20% reagierten (roter Graph: Ba60), war bei den Müllerzellen, die zusätzlich mit EPO behandelt wurden, keine Zunahme der relativen Somafläche zu beobachten (rosa Graph: hypotone Bariumlösung+ 1 nM EPO). Dargestellt sind die MW \pm SEM mehrerer Zellen (n).

Die Ergebnisse der weiteren Versuche werden in Balkendiagrammen gemäß Abb. 6 dargestellt. Sie zeigen die Mittelwerte der Müllerzellsomaflächen in % nach vierminütiger Perfusion der Schnitte mit hypotoner Lösung und den entsprechenden Standardfehler der Mittelwerte. Als Kontrolle gelten die Mittelwerte der relativen Somaflächen bei Perfusion mit EZL60 (blauer Balken / ohne EPO), und als Ba^{2+} -Kontrolle diejenigen aus Experimenten mit hypotoner Bariumlösung (roter Balken Abb. 6). Die Kontrolle zeigte bei jedem Versuch, dass es zu keiner Zunahme der relativen Somafläche in EZL60 kam, während die Ba^{2+} -Kontrolle eine Zunahme der relativen Somafläche um 10-20% zeigte. Alleinige Applikation von EPO in EZL60

verursachte keine Veränderung der Müllerzellsomafläche (Abb. 6), Applikation von EPO in Anwesenheit von Ba^{2+} reduzierte bzw. unterdrückte die Schwellung.

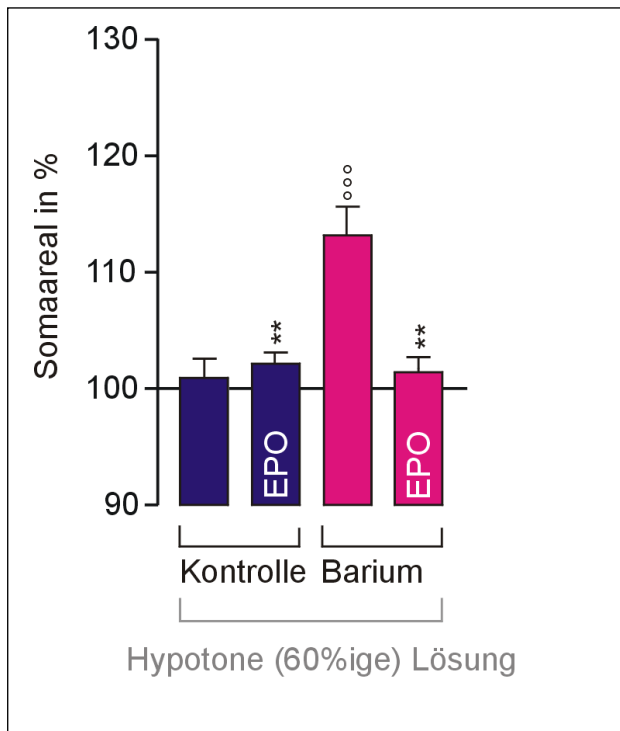


Abbildung 6: Somaflächen der Zellen, die mit verschiedenen hypotonen Lösungen perfundiert wurden.

Die Kontrolle zeigte bei jedem Versuch, dass es zu keiner Zunahme der relativen Somafläche in hypotoner EZL kam (blauer Balken/ ohne EPO) und auch die Zugabe von EPO zu EZL60 keine Größenveränderung verursachte (blauer Balken/ mit EPO).

Als Schwellungskontrolle sind die in hypotoner Bariumlösung perfundierten Müllerzellsomaareale dargestellt (roter Balken / ohne EPO), bei denen es zu einer Somaarealzunahme von 10-20% kam. Diese Schwellung wird durch Zugabe von 1 nM EPO verhindert (roter Balken/ mit EPO).

(n= 7-8)

3.2.1 Konzentrationsabhängigkeit der Schwellungsinhibition durch EPO

In weiteren Versuchen wurde EPO in verschiedenen Konzentrationen getestet. Dabei zeigte sich ein schwellungsinhibierender Effekt bei Konzentrationen von 10 nM, 1 nM und 100 pM, während EPO in einer Konzentration von 10 pM die Müllerzellschwellung durch Ba^{2+} nicht mehr vollständig verhindern konnte. EPO hatte keinen schwellungsinhibierenden Effekt in Konzentrationen von 1 pM und 0,1 pM (Abb. 7). Es wurde bei allen weiteren Versuchen in einer Konzentration von 1 nM eingesetzt, um zuverlässig einen schwellungshemmenden Effekt zu erzielen. Anhand einer Regressionskurve ließ sich für die Schwellungshemmung durch EPO ein EC_{50} -Wert von rund 7 pM ermitteln (Abb. 8).

Ergebnisse

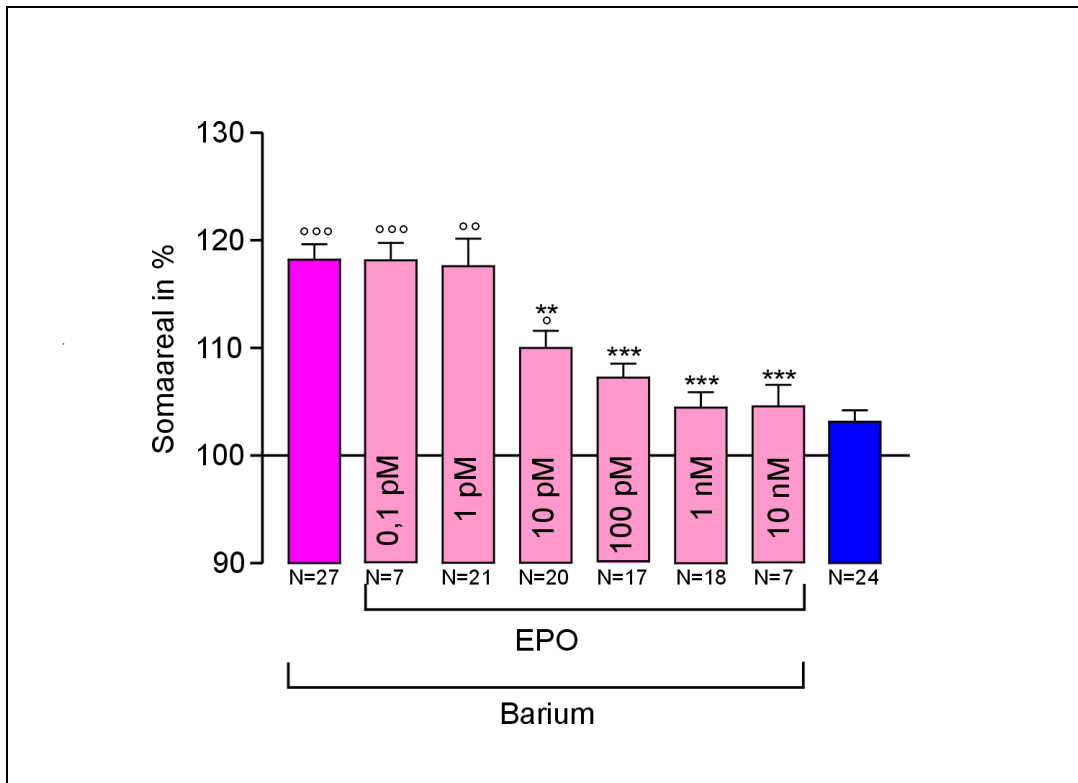


Abbildung 7: Konzentrationsabhängigkeit des schwellungsinhibierenden EPO-Effekts.

Ab einer EPO-Konzentration von mindestens 100 pM tritt keine signifikante Somavolumenzunahme auf, bei 10 pM ist die Schwellungsinhibition unvollständig und unterhalb davon tritt keine schwellungsinhibierende Wirkung auf.

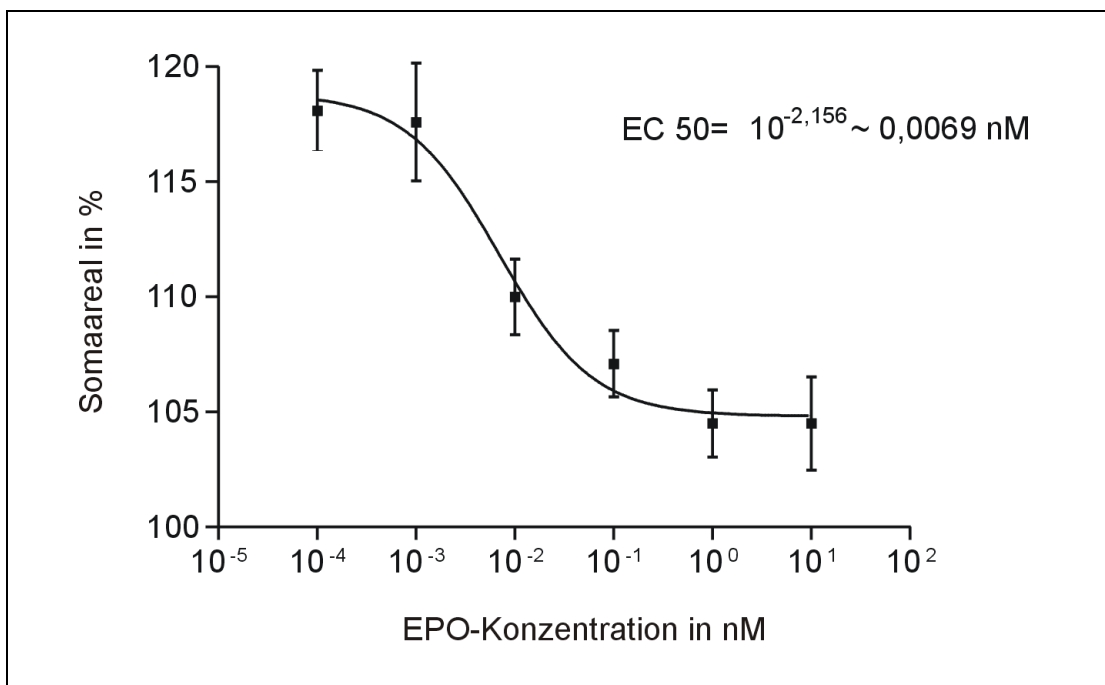


Abbildung 8: Regressionskurve für die Konzentrations-Wirkungs-Beziehung. Viereckige Punkte= Mittelwert der relativen Somaareale für die entsprechende EPO-Konzentration mit dem jeweiligen Standardfehler des Mittelwertes. Der EC_{50} -Wert liegt bei circa 7 pM. Bei dieser Konzentration kommt es zu einer relativen Somaflächenzunahme von rund 111%, gemäß der Regressionskurve. Dabei ist zu beachten, dass auch bei den höchsten EPO-Konzentrationen nicht der Wert von 100% für die Somagröße erreicht wurde, allerdings bestand kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle (siehe Abb. 6).

3.3 EPO und die Wirkung von Entzündungsmediatoren

Es ist bekannt, dass Retinaerkrankungen wie diabetische Retinopathie oder Makulaödem pathogenetisch mit einer lokalen Entzündungsreaktion und oxidativem Stress einhergehen (Leal et al. 2005, Joussen 2001). So gelten Arachidonsäure und ihre Metabolite als Hauptmediatoren des Makulaödems (Guex-Crosier 1999; Miyake, Ibaraki 2002). Staub et al. (1994b) konnten eine durch Arachidonsäure verursachte Schwellung bei Astrozyten nachweisen. Deshalb wurde die Wirkung von Arachidonsäure auch an Müllerzellen untersucht. Die Applikation von Arachidonsäure in EZL60 bewirkte eine Schwellung der Müllerzellsomata (Abb. 9). Da in Retinae diabetischer Ratten eine verstärkte Aktivität der Cyclooxygenase 2 und ein erhöhter Prostaglandin E₂-Spiegel nachgewiesen wurden (Du et al. 2004), wurde das Schwellungsverhalten der Müllerzellen auch unter Zugabe von Prostaglandin E₂ (PGE₂) untersucht. Auch PGE₂ bewirkte in EZL60 eine Zellschwellung (Abb. 9). Weiterhin kommt es bei Entzündungsvorgängen zu oxidativem Stress im Gewebe. So konnten Kowluru und Kennedy (2001) in diabetischen Netzhäuten H₂O₂ in erhöhter Menge nachweisen. Die

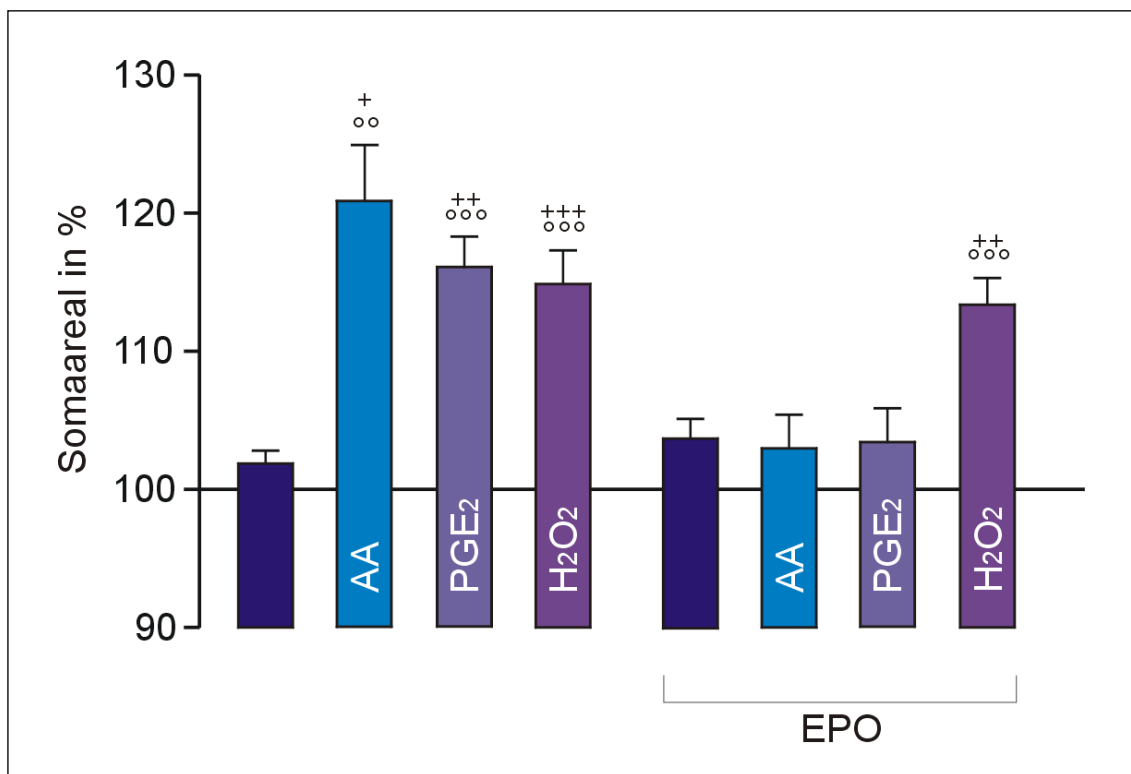


Abbildung 9: Schwellungsinduktion durch Entzündungsmediatoren und deren Hemmung durch EPO. In EZL60 bewirkten Arachidonsäure (AA), Prostaglandin E₂ (PGE₂) und Wasserstoffperoxid (H₂O₂) eine Schwellung der Müllerzellsomata. Die durch Prostaglandin E₂ und Arachidonsäure verursachte Schwellung konnte durch EPO aufgehoben werden, während EPO keinen Einfluss auf die durch Wasserstoffperoxid verursachte Schwellung hatte. (n=5-21)

Gabe von H_2O_2 im Experiment verursachte eine Schwellung der Müllerzellen (Abb. 9). Im nächsten Schritt wurde überprüft, ob EPO die Effekte der Entzündungsmediatoren beeinflussen kann. Durch Gabe von EPO konnte die durch Arachidonsäure und PGE_2 induzierte Schwellung verhindert werden. Im Gegensatz dazu wurde der Effekt von H_2O_2 durch EPO nicht signifikant verkleinert (Abb. 9).

3.4 Die Signalkaskade der Schwellungsinhibition

Für die Schwellungsinhibition durch Neuropeptid Y und VEGF wurde eine purinerge Signalkaskade beschrieben, in deren Verlauf es zu einer Glutamatrezeptoraktivierung kommt und die mit einer durch Adenosinrezeptoren vermittelten Öffnung von Kalium- und Chloridkanälen endet (Uckermann et al. 2006, Wurm et al. 2008).

Zudem konnte gezeigt werden, dass bei Gliazellen der Mausretina diese Signalkaskade zur Homöostase des zellulären Volumens unter hypotonen Bedingungen bereits intrinsisch aktiv ist (Wurm et al. 2009a). Um herauszufinden, ob Gliazellen der Rattenretina dieselbe endogene Signalkaskade für ihre Zellvolumenregulation unter hypotonen Bedingungen nutzen, wurden verschiedene blockierende Substanzen verwendet.

Wie in Abb. 10 gezeigt, wurde durch folgende Substanzen, die die Schritte am Beginn des für VEGF beschriebenen Signalweges blockieren (Wurm 2008), keine Schwellung hervorgerufen: SU1498, Inhibitor des VEGF-Rezeptorkinase KDR/flk-1, BAPTA/AM, ein zellpermeabler Calciumchelator, LY341495, ein Antagonist für metabotrope Glutamatrezeptoren der Gruppe II.

Im Gegensatz dazu induzierten folgende Substanzen, die bedeutende Schritte am Ende der Signalkaskade inhibieren, eine Schwellung: MRS2179, ein P2Y_1 -Rezeptorantagonist, und DPCPX, ein A_1 -Rezeptorantagonist.

Diese Daten bestätigen die Hypothese einer intrinsischen Aktivität der purinergen Signalkaskade in Müllerzellen der Ratte, wie sie zuvor bei der Maus gefunden wurde. Auch in der Rattenretina scheint die Volumenregulation der Müllerzellen unter hypotonen Bedingungen unter Einbeziehung von P2Y_1 - und A_1 -Rezeptoren abzulaufen, während VEGF, intrazellulärer Ca^{2+} -Anstieg und Aktivierung metabotroper Glutamatrezeptoren offensichtlich keine Rolle spielen.

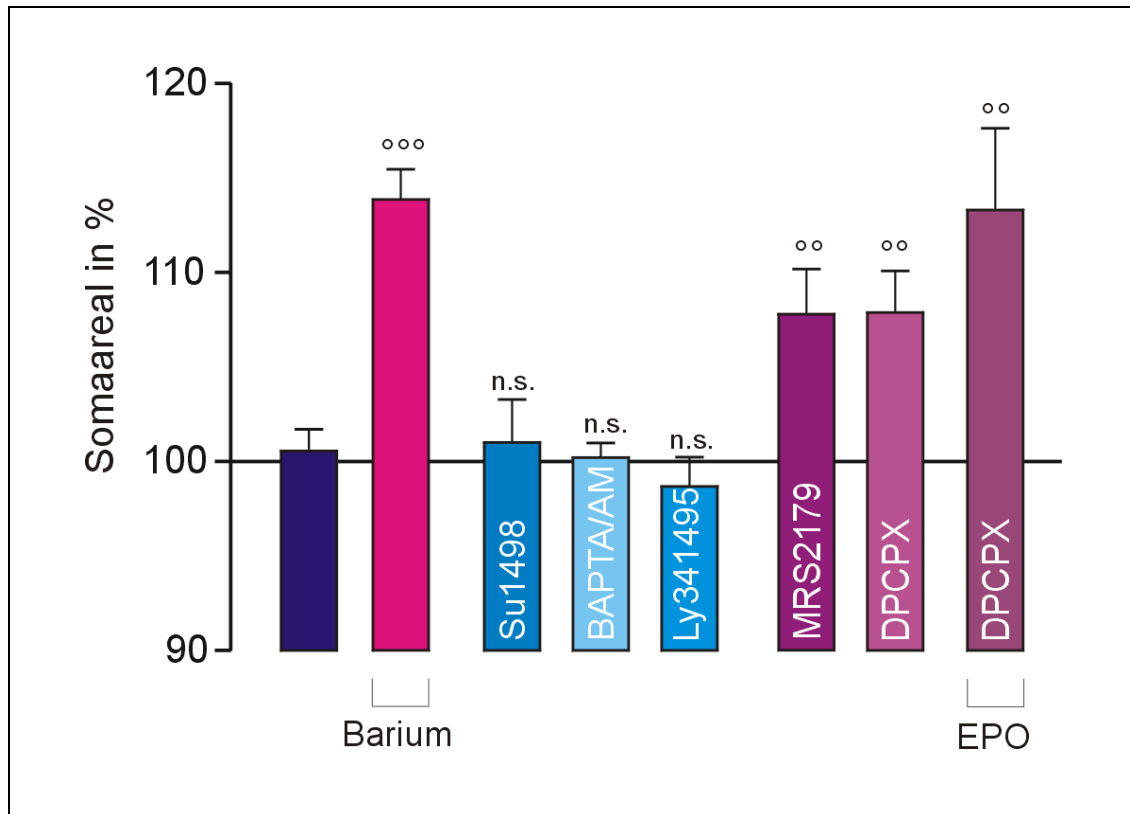


Abbildung 10: Intrinsische Aktivität der purinergen Signalkaskade.

Die Blockade der Anfangsschritte der Signalkaskade mit SU1498, KDR/flk-1-Inhibitor, BAPTA/AM, intrazellulärer Calciumchelator und LY341495, ein mGluR II- Blocker, riefen keine Schwellung der Zellen in hypotoner Lösung hervor.

Hingegen konnte durch Zugabe von MRS2179, ein P2Y₁-Blocker, und DPCPX, ein A₁-Rezeptorantagonist, eine Schwellung hervorgerufen werden. Die durch DPCPX induzierte Schwellung ließ sich nicht durch EPO aufheben. (n=7-19)

Im Folgenden wurde die EPO-Wirkung und die Wirkung weiterer Agonisten der Signalkaskade unter Einfluss von löslichem EPO-Rezeptor untersucht (Abb. 11). Dieser hob die durch EPO hervorgerufene Schwellungsinhibition auf. Auf die Schwellungsinhibition durch VEGF oder Glutamat hatte der lösliche EPO-Rezeptor jedoch keinen Einfluss. Die bariuminduzierte Schwellung wurde durch den löslichen EPO-Rezeptor nicht aufgehoben.

Die Ergebnisse dieser Experimente weisen darauf hin, dass auch EPO eine Aktivierung der purinergen Signalkaskade auslöst. Deshalb wurden im Folgenden verschiedene Antagonisten dieses Signalweges unter Blockade der einwärtsgerichtenden Kaliumkanäle mit Bariumionen untersucht.

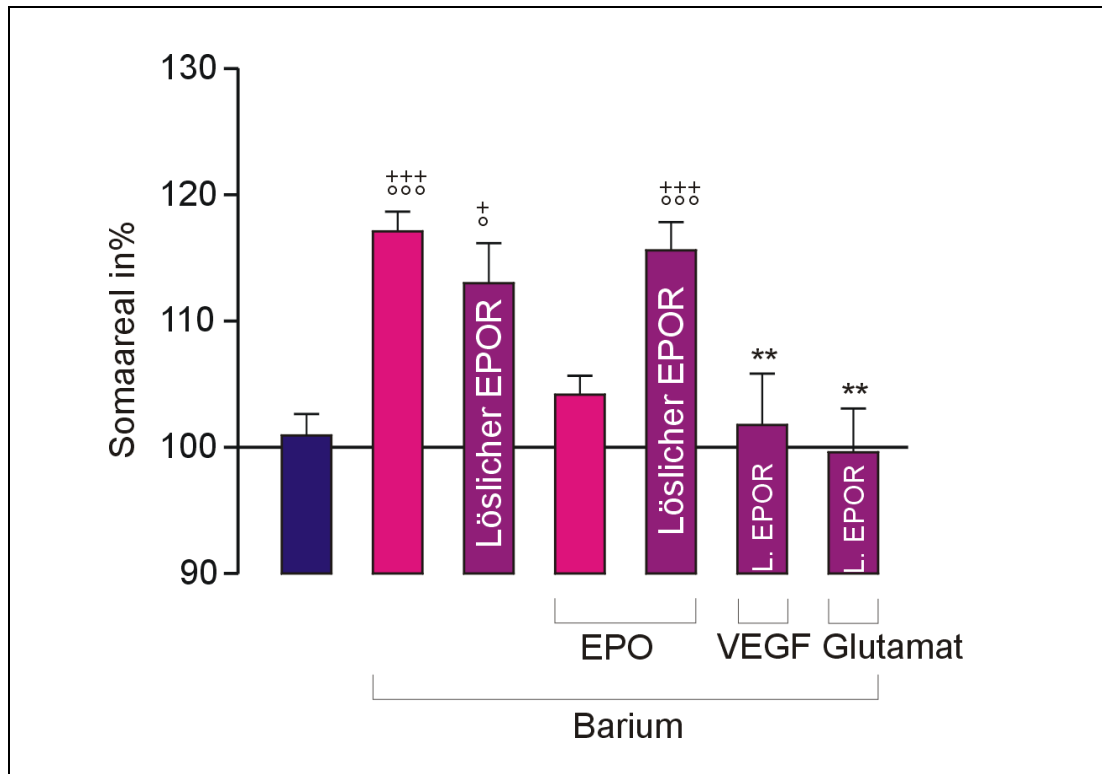


Abbildung 11: Die Schwellungsinhibition von EPO, VEGF und Glutamat unter Einfluss von löslichem EPO-Rezeptor (EPOR).

Der lösliche EPO-Rezeptor konnte die schwellungshemmende Wirkung von EPO, aber nicht von VEGF und Glutamat aufheben. Der lösliche EPO-Rezeptor allein hatte keinen Einfluss auf die durch Barium induzierte Schwellung.

3.4.1 Die Beteiligung von K^+ / Cl^- - Kanälen an der Schwellungsinhibition durch EPO

Eine Möglichkeit, einen Wassereinstrom in hypotoner Lösung zu vermeiden, ist die Abgabe von Osmolyten in den Extrazellulärraum durch die Müllerzellen. Zur Ausschleusung von osmotisch wirksamen Ionen können neben den K^+ -Kanälen, die durch Ba^{2+} blockiert werden, Zwei-Poren- K^+ -Kanäle und Chloridkanäle dienen (Reichenbach et al. 2007). Zur Untersuchung, ob diese Kanäle in den Mechanismus der Schwellungsinhibition durch EPO involviert sind, wurden die K^+ -Kanalblocker Clofilium und Chinin und die Chloridkanalblocker Flufenamic Acid und NPPB in Schwellungsexperimenten eingesetzt. Dabei zeigte sich, dass die Ba^{2+} -induzierte Schwellung durch alleinige Applikation dieser Blocker nicht signifikant verändert wird (Abb. 12). Hingegen wurde sowohl durch Clofilium und Chinin, als auch durch Flufenamic Acid und NPPB der schwellungshemmende Effekt von EPO aufgehoben. Dies deutet darauf hin, dass die EPO-Wirkung im Endeffekt auch auf einer Aktivierung von K^+ - und Cl^- -Kanälen beruht.

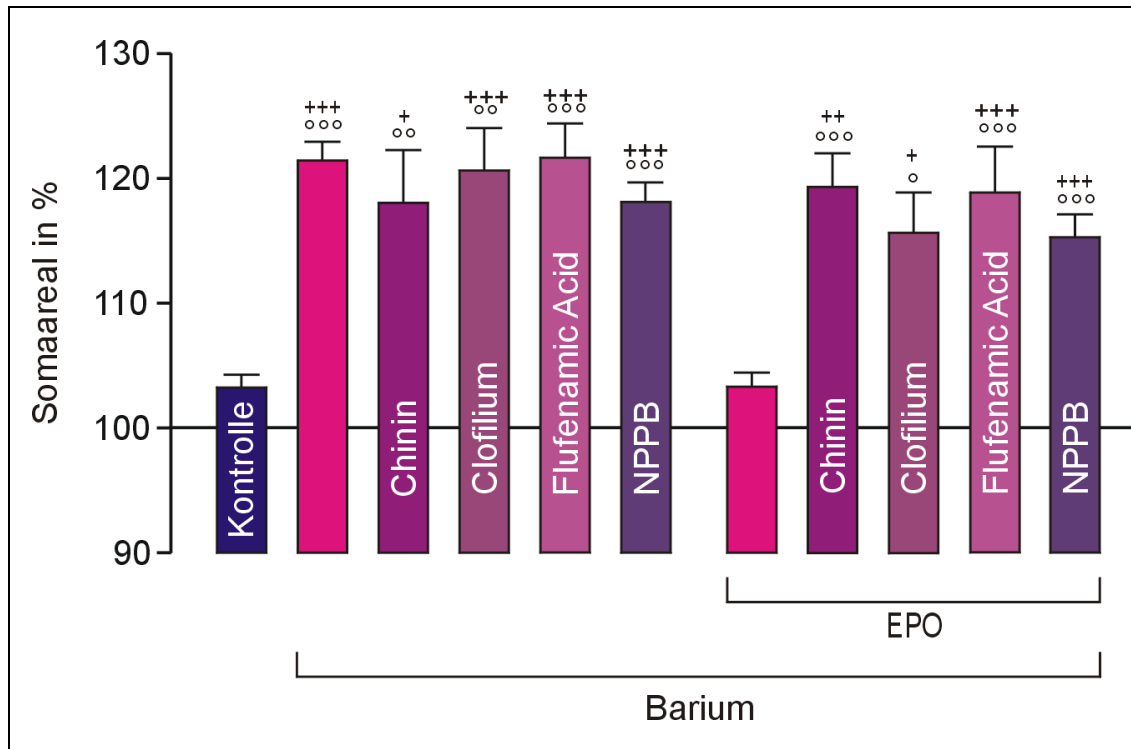


Abbildung 12: Der Effekt von Kalium- und Chloridkanalblockern auf die Schwellungshemmung durch EPO. Die durch Ba^{2+} induzierte Schwellung konnte durch Gabe von Chinin, Clofilium, Flufenamic Acid und NPPB nicht beeinflusst werden. Die Schwellungsinhibition durch EPO konnte durch Gabe der Kanalblocker unterdrückt werden. (n=6-20)

3.4.2 Beteiligung von Adenosinrezeptoren an der Schwellungsinhibition durch EPO

Nachdem nachgewiesen wurde, dass die Schwellungsinhibition durch Aktivierung von K^+ - und Cl^- -Kanälen vermittelt wird, wurde im Weiteren die Rolle von Adenosin und seinen Rezeptoren in diesem Prozess untersucht (Abb. 13). Während einer Ischämie in der Retina kann akut Adenosin freigesetzt werden (Roth et al. 1997). Dieses übt über A_1 -Rezeptoren einen gewebsschützenden Effekt aus (Larsen, Osborne 1996; Ghiardi et al. 1999). Es ist auch bekannt, dass die Aktivierung von A_1 -Rezeptoren an Müllerzellen die Öffnung von barium- und arachidonsäureinsensitiven Kalium- und Chloridkanälen bewirkt (Skatchkov et al. 2006). Es wurde zuerst der selektive Antagonist von A_1 -Rezeptoren DPCPX eingesetzt. Dabei zeigte sich, dass die Schwellungsinhibition von EPO durch Zugabe von DPCPX in hypotoner Bariumlösung aufgehoben wurde, während der Blocker allein in hypotoner Bariumlösung keine Änderung der Müllerzellenschwellung verursachte.

Durch Aktivierung von A_1 -Rezeptoren kann letztlich die Proteinkinase A (PKA) aktiviert werden (Uckermann et al. 2005). Deshalb wurde auch bei der Gabe von EPO der Inhibitor der Proteinkinase A, H-89, getestet. Die Inhibition der Ba^{2+} -induzierten

Schwellung durch EPO konnte durch H-89 aufgehoben werden, während H-89 keinen signifikanten Einfluss auf die Schwellung hatte.

Des Weiteren wurde in früheren Arbeiten die Beteiligung der Phosphatidylinositol-3-Kinase an den Signalwegen, die zur A_1 -Rezeptor-vermittelten Öffnung von Ionenkanälen führen, nachgewiesen (Wurm et al. 2008). So wurde als zellpermeabler Blocker der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-Kinase) die Substanz LY 29-4002 verwendet, um zu überprüfen, ob dieses Enzym auch an der durch EPO ausgelösten Schwellungsinhibition beteiligt ist. LY 29-4002 hob den EPO-Effekt auf und hatte keinen Einfluss auf das Schwellungsverhalten der Zellen in hypotoner Bariumlösung. Dies deutet darauf hin, dass die durch EPO ausgelöste Signalkaskade zur Aktivierung von A_1 -Rezeptoren führt und dass Phosphatidylinositol-3-Kinase und Proteinkinase A an den nachfolgenden Signalwegen beteiligt sind.

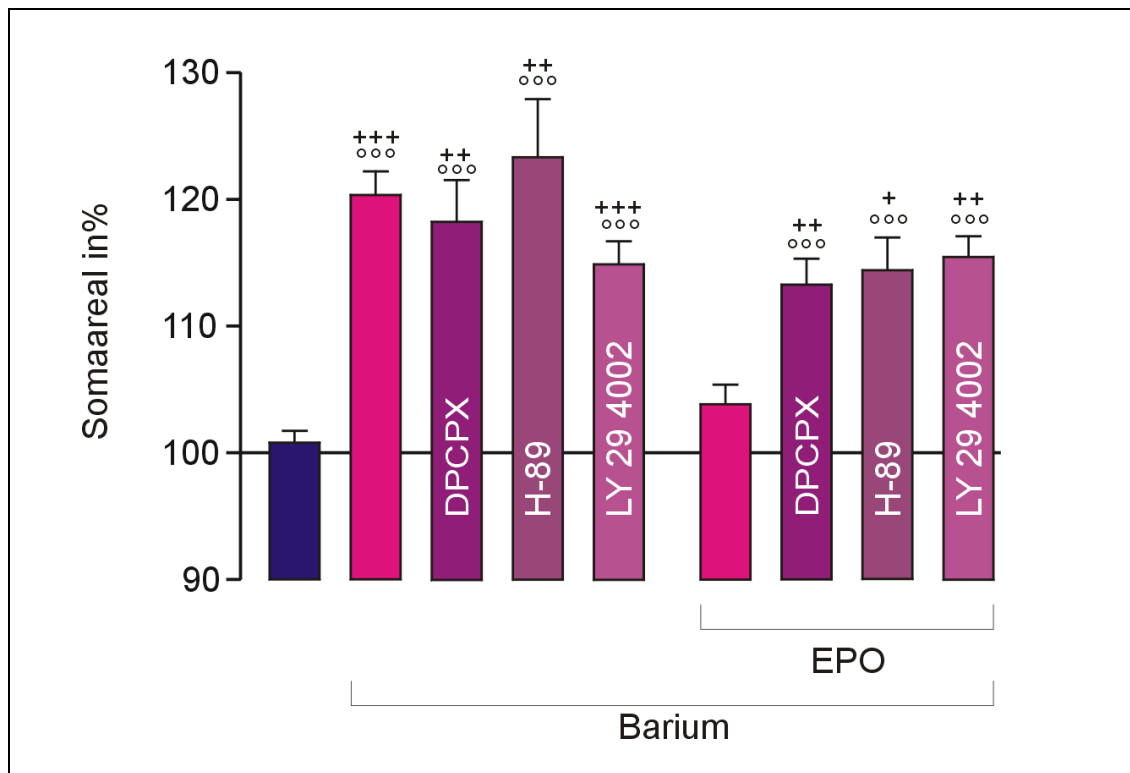


Abbildung 13: Beteiligung von Adenosinrezeptoren und Kinasen an der Schwellungsinhibition durch EPO. Der A_1 -Rezeptorblocker DPCPX konnte die durch EPO vermittelte Schwellungshemmung aufheben. Die Antagonisten der PKA und PI3-Kinase, H-89 und LY29-4002, konnten ebenfalls die Schwellungsinhibition durch EPO aufheben. Alle drei Substanzen hatten keinen Effekt auf die Schwellung in hypotoner Bariumlösung. (n=6-21)

Daraus ergibt sich die Frage, woher das Adenosin zur Aktivierung des A_1 -Rezeptors stammt. Es kommen zwei Möglichkeiten in Betracht: die extrazelluläre Spaltung von Nukleotiden durch die Ekto-5'-Nukleotidase oder der Transport von intrazellulärem Adenosin nach außen durch einen Nukleosidtransporter.

Deshalb wurde der Einfluss von AOPCP, einem Inhibitor der Ekto-5'-Nukleotidase, und NBTI, einem Blocker der Nukleosidtransporter, auf die EPO- Wirkung untersucht. Es zeigte sich, dass AOPCP keinen Einfluss auf die EPO- Wirkung hatte, also EPO weiterhin die Ba^{2+} -induzierte Müllerzellschwellung verhindern konnte. NBTI hingegen hob den EPO- Effekt auf, die Müllerzellsomata schwellen in Anwesenheit von Ba^{2+} trotz EPO- Zugabe. Diese Daten (Abb. 14) deuten darauf hin, dass das Adenosin, das bei der Schwellungshemmung eine Rolle spielt, durch NBTI-sensitive Transporter aus der Zelle ausgeschleust wird, während der extrazelluläre Abbau von AMP zu Adenosin offensichtlich keine Rolle spielt.

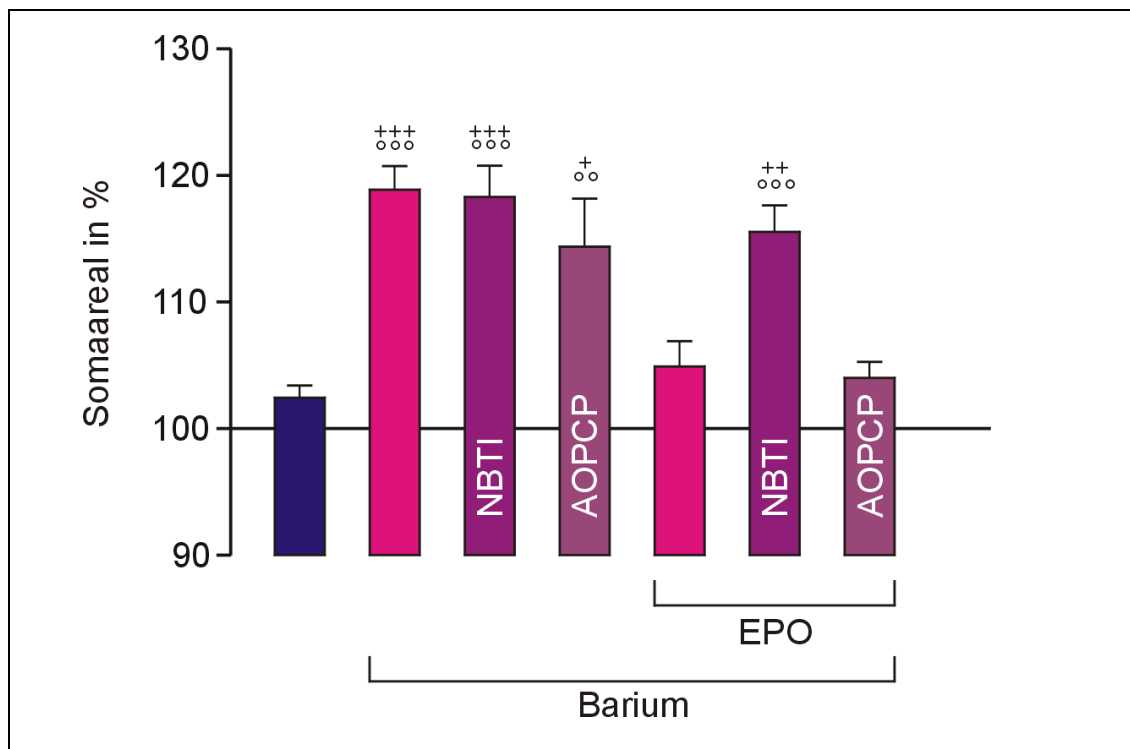


Abbildung 14: Art der Adenosinfreisetzung.

AOPCP, ein Ekto-5'- Nukleotidaseinhibitor, hatte keinen Einfluss auf die Schwellungsinhibition durch EPO, während NBTI, ein Nukleosidtransporterblocker, den schwellungsinhibierenden Effekt von EPO aufhob. Beide Substanzen hatten keinen Einfluss auf die Schwellung in Abwesenheit von EPO. (n=6-18)

3.4.3 Beteiligung von P2Y-Rezeptoren

Kalisch et al. (2006) beschrieben, dass eine $P2Y_1$ -Rezeptoraktivierung bei der Müllerzellschwellungsinhibition die Adenosinfreisetzung auslöst. $P2Y_1$ -Rezeptoren werden auf den inneren Fortsätzen von Müllerzellen exprimiert (Ward, Flechter 2009, Wurm et al. 2009 b).

Deshalb wurde MRS2179, ein kompetitiver $P2Y_1$ -Rezeptorantagonist, im Experiment mit EPO eingesetzt. Es zeigte sich, dass MRS2179 die schwellungshemmende Wirkung des EPO aufhob und die Ba^{2+} -induzierte Müllerzellschwellung nicht beeinflusste

(Abb. 15). Dies ist ein Beleg für die Involvierung von P2Y₁-Rezeptoren in die durch EPO ausgelöste Signalkaskade.

ADP ist ein selektiver Agonist von P2Y₁-Rezeptoren (Abbraccio et al. 2006). Es konnte gezeigt werden, dass das wichtigste Enzym zum Abbau von Nukleotiden im Parenchym der Nagetierretina die NTPDase2 ist. Dieses Enzym wird auf Müllerzellen exprimiert (Iandiev et al. 2007). Es baut bevorzugt ATP zu ADP ab. Müllerzellen können nach Glutamaterezeptoraktivierung ATP endogen freisetzen (Uckermann et al. 2006; Wurm et al. 2008). Um zu überprüfen, ob auch die Schwellungsinhibition durch EPO die extrazelluläre Bildung von ADP durch NTPDase2 voraussetzt, wurde ARL67156, ein NTPDase-Inhibitor, eingesetzt. Die Schwellungsinhibition durch EPO konnte durch Gabe von ARL67156 aufgehoben werden (Abb. 15), was ein Beleg dafür ist, dass extrazellulärer Abbau von ATP zu ADP ein wichtiger Schritt in einer durch EPO aktivierten Signalkette ist, die zur Schwellungsinhibition führt. MRS2179 und ARL67156 hatten keinen Einfluss auf das Schwellungsverhalten in Ba²⁺-haltiger Lösung ohne EPO (Abb. 15).

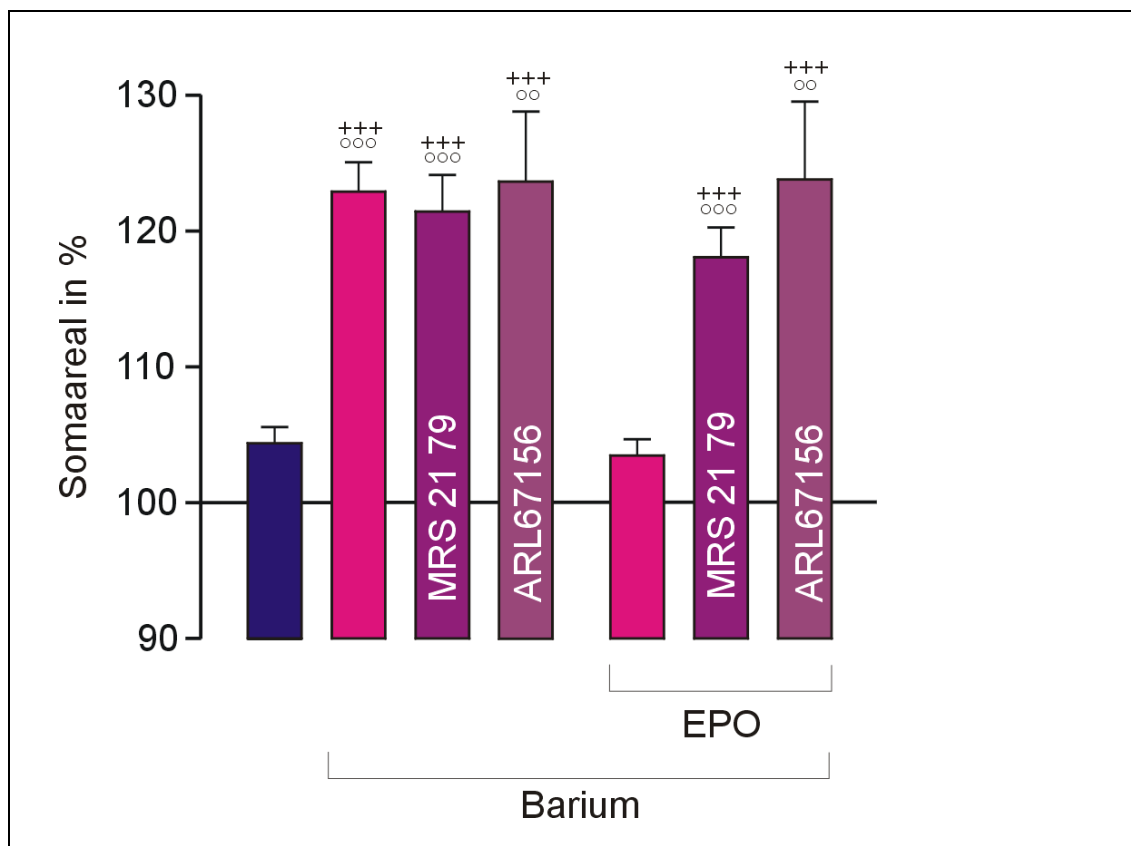


Abbildung 15: Die Einbindung von P2Y₁-Rezeptoren in den EPO- Signalweg zur Schwellungsinhibition. Die durch EPO induzierte Schwellungsinhibition wird sowohl durch den P2Y₁-Antagonisten MRS2179, als auch durch den Ekto-ATPase-Inhibitor ARL67156 aufgehoben. In hypotoner Bariumlösung haben MRS2179 und ARL67156 keinen zusätzlichen schwellungshemmenden oder -fördernden Effekt. (n=7-34)

3.4.4 Involvierung von Glutamatrezeptoren in die schwellungsinhibierende Wirkung von EPO

Aus den Befunden des vorhergehenden Kapitels ergibt sich die Frage, wo das extrazelluläre ATP, das dann als Substrat für den Abbau zu ADP und die folgende Aktivierung von P2Y₁-Rezeptoren zu Verfügung steht, herstammt. Es ist bekannt, dass eine ATP-Freisetzung von Müllerzellen durch Glutamat ausgelöst werden kann (Kalisch et al. 2006; Wurm et al. 2008). Deshalb wurde die Rolle von Glutamatrezeptoren bei der durch EPO vermittelten Schwellungsinhibition untersucht. Dazu wurden Antagonisten für metabotrope Glutamatrezeptoren der Gruppe I verwendet: CPCCOEt als mGluR₁-Antagonist und MPEP als mGluR₅-Antagonist. Für die Gruppe II wurde EGLU als gruppenspezifischer Antagonist und als mGluR₃-spezifischer Antagonist wurde LY-34 1495 verwendet. Bei Zugabe zur EPO- enthaltenden Bariumlösung wurde durch alle vier Antagonisten der EPO- Effekt aufgehoben, das heißt, dass die Zellen trotz EPO schwollen. Durch die Zugabe der mGluR-Blocker zur hypotonen Bariumlösung wurde die Schwellung der Zellen weder gehemmt noch zusätzlich vermehrt (Abb. 16). Dies

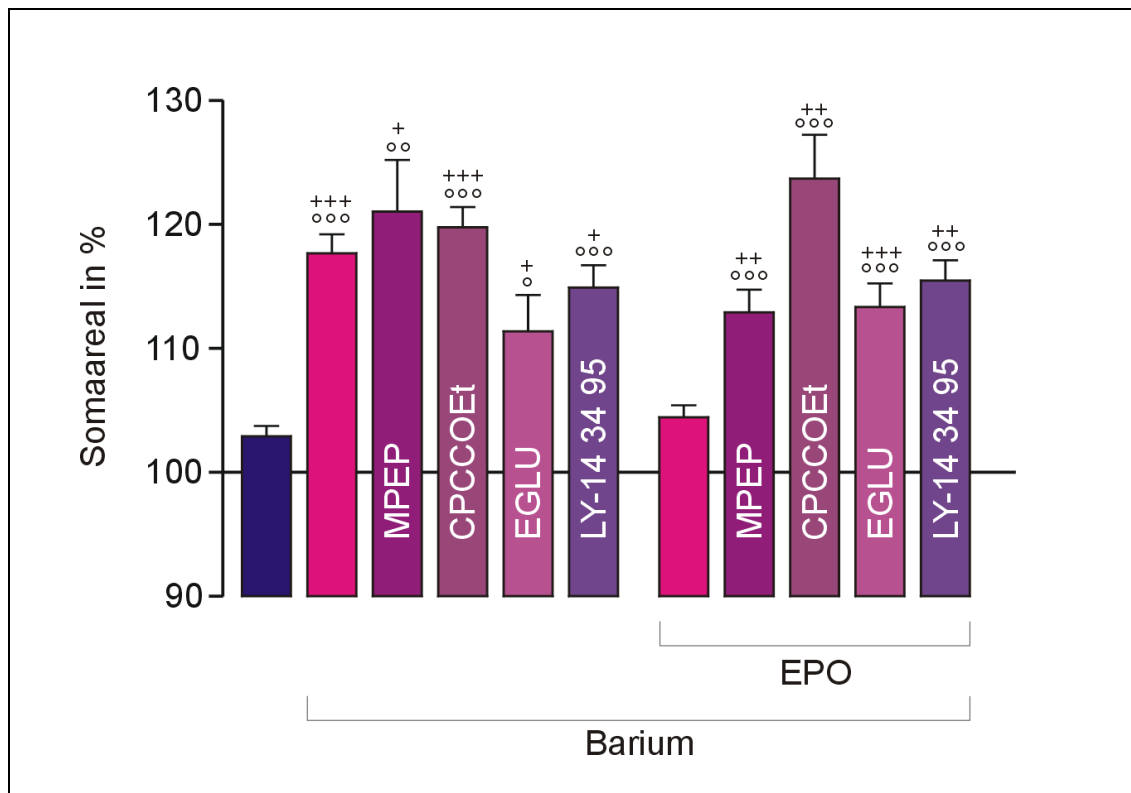


Abbildung 16: Die Bedeutung von Glutamatrezeptoren für den schwellungsinhibierenden Effekt von EPO. Die Blocker metabotroper Glutamatrezeptoren CPCCOEt (mGluR₁, Gruppe I), MPEP (mGluR₅, Gruppe I), EGLU (Gruppe II) und LY-341495 (mGluR₃, Gruppe II) zeigen keine signifikante Einflussnahme auf die Schwellung der Zellsomata in hypotoner Bariumlösung. Die schwellungsinhibierende Wirkung von EPO wird aber durch CPCCOEt, MPEP, EGLU und LY-143495 aufgehoben. Dies weist auf eine Aktivierung von metabotropen Glutamatrezeptoren der Gruppe I und II im Zuge der durch EPO aktivierten Signalkaskade hin. (n=7-24)

spricht dafür, dass metabotrope Glutamatrezeptoren der Gruppen I und II in die durch EPO ausgelöste Signalkaskade involviert sind. Es scheinen mehrere mGluRs beteiligt zu sein, aber es reicht, einen davon zu blocken, um die Signalkaskade zu unterbrechen.

3.4.5 Möglichkeiten der Glutamatfreisetzung innerhalb der durch EPO aktivierten Signalkaskade

Das zur Rezeptoraktivierung benötigte Glutamat könnte aus Neuronen oder Müllerzellen stammen. Während eine Glutamatfreisetzung aus Neuronen an glutamatergen Synapsen lange bekannt ist, konnte mittlerweile auch gezeigt werden, dass es in Astrozyten eine calciumabhängige Glutamatausschüttung gibt (Parpura et al. 1994; Parpura, Haydon 2000).

Zuerst sollte untersucht werden, ob EPO eine vesikuläre Ausschüttung von Glutamat initiiert. Dazu wurde der Inhibitor der vakuolischen H^+ -ATPase Bafilomycin A1 genutzt, der die Beladung sekretorischer Vesikel mit Glutamat unterdrückt. Nach Vorinkubation mit Bafilomycin A1 konnte EPO die Schwellung in Ba^{2+} -haltiger Lösung nicht mehr verhindern. Dies ist ein Hinweis auf eine mögliche vesikuläre Ausschüttung von Glutamat im Verlauf der Schwellungsinhibition durch EPO. Bafilomycin A1 hatte keinen Effekt auf die Ba^{2+} -induzierte Müllerzellschwellung (Abb. 17).

Es ist bekannt, dass die Proteinkinase C (PKC) auf vielfältige Art und Weise in intrazelluläre Signalprozesse involviert sein kann. Wurm et al. (2008) konnten zeigen, dass der PKC-Hemmer Gö6976 auch die Schwellungsinhibition durch VEGF aufheben kann. Es sollte nun überprüft werden, ob eine Hemmung der PKC auch den schwellungsinhibierenden Effekt von EPO beeinflusst. Gabe von Gö6976 beeinflusste das Ausmaß der Ba^{2+} -induzierten Schwellung nicht, hob aber die EPO-Wirkung in hypotoner Bariumlösung auf (Abb. 17). Das Ergebnis zeigt, dass die PKC am EPO-Signalweg beteiligt ist. In einer Vielzahl von Zelltypen kann die PKC durch Phosphorylierung verschiedene Schritte der Exozytose regulieren (Morgan et al. 2005). Ob aber im vorliegenden Fall durch Hemmung der PKC die Exocytose von Glutamat direkt unterdrückt oder ein anderer Schritt im Signalweg zwischen EPO und Glutamatausschüttung blockiert wird, ist anhand der vorliegenden Daten nicht eindeutig zu entscheiden.

Die Exocytose ist ein calciumabhängiger Prozess. Allerdings können intrazelluläre Calciumkonzentrationsänderungen eine Vielzahl weiterer intrazellulärer Vorgänge

Ergebnisse

beeinflussen, unter anderem die Aktivität der PKC (Kikkawa et al. 1982). Im Folgenden wurde versucht, Calciumkonzentrationsanstiege pharmakologisch zu unterdrücken. Dazu wurde zunächst der intrazellulär wirkende Calciumchelator BAPTA/AM getestet. Die schwellungshemmende Wirkung von EPO wurde durch Vorinkubation mit dem Calciumchelator aufgehoben, so dass die Zellen trotz EPO schwellen. Es zeigte sich damit, dass der EPO-Effekt vom Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration abhängig ist.

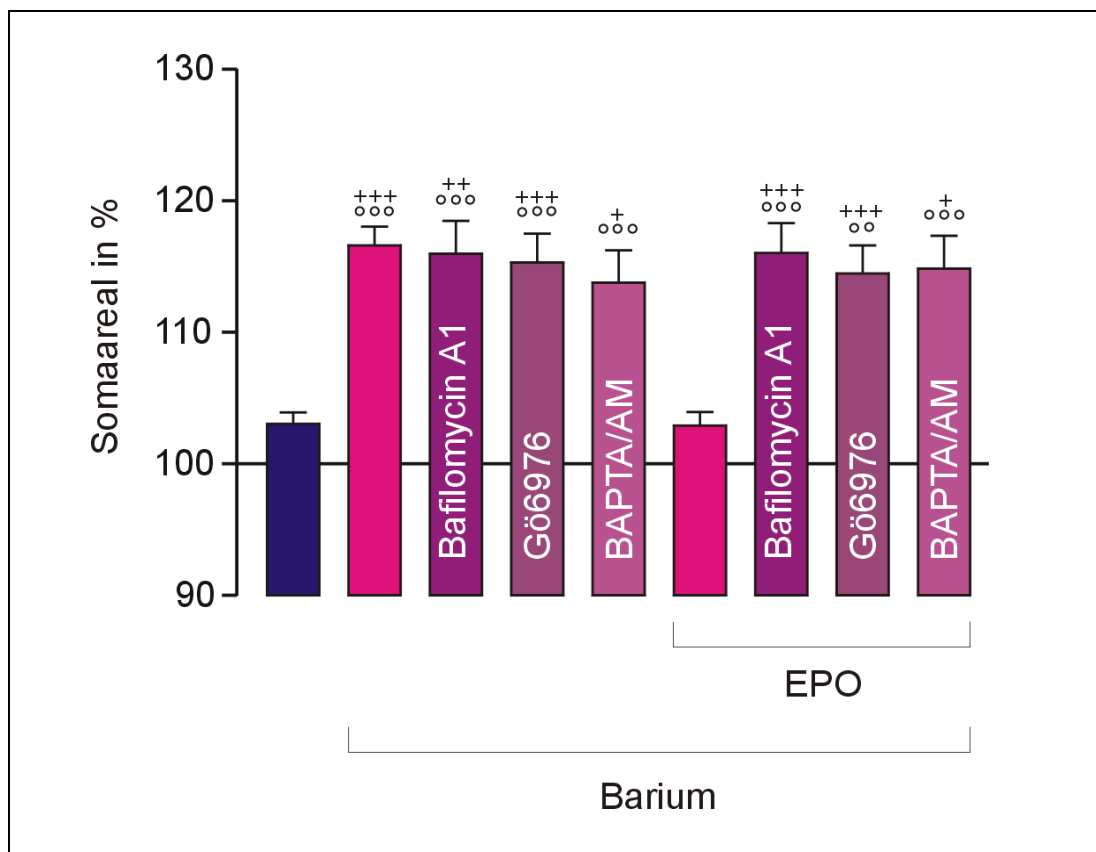


Abbildung 17: Abhängigkeit der EPO-Wirkung von Vesikelausschüttung, intrazellulären Signalwegen und der intrazellulären Calciumkonzentration (Teil 1). Bafilomycin A1, Inhibitor der VAPase, Gö6976, PKC-Inhibitor und BAPTA/AM, ein intrazellulärer Calciumchelator, heben die durch EPO verursachte Schwellungsinhibition wieder auf. Die Substanzen selbst verursachen keine Änderung im Schwellungsverhalten der Müllerzellen in hypotoner Bariumlösung. (n=12-17)

Calciumkonzentrationsänderungen können unter anderem durch Aktivierung der Phospholipase C ausgelöst werden. Phospholipase C setzt aus Phosphatidylinositolen Inositol-1, 4, 5-triphosphat frei, das wiederum Calcium aus intrazellulären Speichern mobilisieren kann. In Astrozyten konnte U73122, ein Phospholipase C-Inhibitor, die Glutamatausschüttung durch Abschwächung intrazellulärer Calcium-Anstiege reduzieren (Jeremic et al. 2001). Neben der Induktion des Calciumanstiegs wird bei Aktivität der Phospholipase C Diacylglycerol freigesetzt, das wiederum bei der

Aktivierung der PKC eine Rolle spielt (Kikkawa et al. 1982). Es wurde überprüft, ob Hemmung der Phospholipase C die EPO-Wirkung auf Müllerzellen beeinflusst. Die schwellungshemmende Wirkung des EPO wurde durch Zusatz von U73122 aufgehoben. Die Ba^{2+} -induzierte Müllerzellschwellung änderte U73122 jedoch nicht (Abb. 18). Es zeigte sich somit, dass Phospholipase C eine Rolle in der durch EPO vermittelten Signalkaskade spielt. Allerdings kann aufgrund der Tatsache, dass es durch Aktivität der Phospholipase C sowohl zu einem Anstieg der Calciumkonzentration als auch zur Freisetzung von Diacylglycerol kommt, nicht eindeutig entschieden werden, welche Wirkung von Phospholipase C entscheidend ist. Die wichtige Rolle des Calciumanstiegs wird aber durch die Wirkung von BAPTA/AM demonstriert.

Der zur Exocytose von glutamathaltigen Vesikeln nötige Calciumanstieg kann aber auch durch spannungsabhängige Kanäle in der Zellmembran induziert werden. So könnte es durch die Aktivierung spannungsabhängiger Na^+ -Kanäle zu einer Depolarisation der Zelle kommen, die wiederum spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle aktiviert. Der daraus resultierende Ca^{2+} -Einstrom setzt dann die Exocytose in Gang. Um

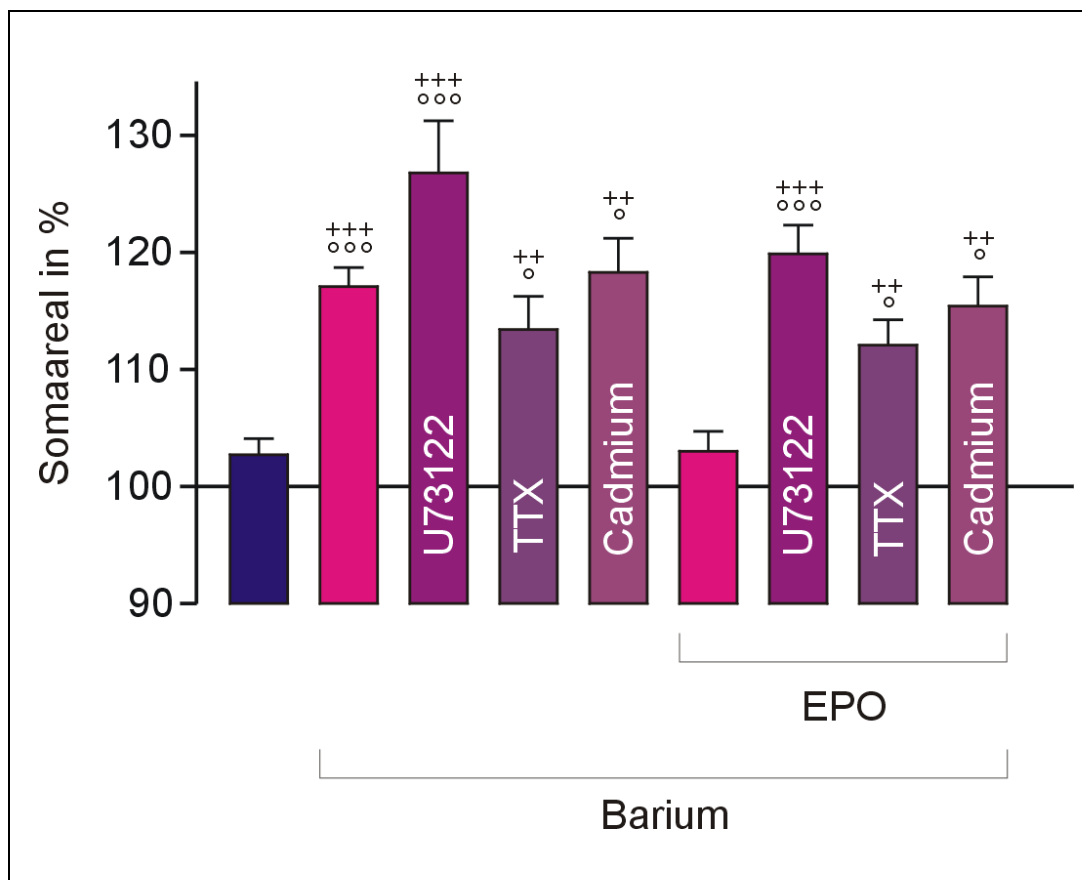


Abbildung 18: Abhängigkeit der EPO-Wirkung von Vesikelausschüttung, intrazellulären Signalwegen und der intrazellulären Calciumkonzentration (Teil 2). In Anwesenheit des Inhibitors der Phospholipase C, U73122, sowie der Blocker von spannungsabhängigen Na^+ bzw. Ca^{2+} -Kanälen, Tetrodotoxin und Cadmium, schwollen die Zellen trotz Gabe von EPO. Die Substanzen verursachen aber selbst keine Änderung im Schwellungsverhalten der Müllerzellen in hypotoner Bariumlösung. (n=6-13)

zu überprüfen, ob diese Mechanismen auch bei der durch EPO induzierten Signalkaskade eine Rolle spielen, wurde Tetrodotoxin als Blocker spannungsabhängiger Na^+ -Kanäle und Cadmium als Blocker von spannungsabhängigen Calciumkanälen getestet. Sowohl Tetrodotoxin als auch Cadmium hoben den EPO-Effekt auf. Beide Blocker beeinflussten die durch Ba^{2+} -induzierte Schwellung nicht (Abb. 18). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass sowohl spannungsabhängige Na^+ - als auch Ca^{2+} -Kanäle für den Ablauf der Signalkaskade zur Schwellungsinhibition wichtig sind.

Allerdings scheint die Glutamatfreisetzung von vielen Faktoren abzuhängen, deren Bedeutung bisher nicht eindeutig geklärt werden konnte und deshalb mit spezielleren Methoden wie dem Calciumimaging zu untersuchen ist.

3.4.6 Beteiligung von VEGF an der durch EPO induzierten Signalkaskade

Aus der Literatur ist bekannt, dass die Behandlung von Zellkulturen neuronaler Vorläuferzellen mit rekombinantem EPO die Expression und Sekretion von VEGF signifikant erhöht (Wang et al. 2008). Davon ausgehend wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob VEGF auch bei der Inhibition der Müllerzellschwellung durch EPO eine Rolle spielt. VEGF bindet an Rezeptor-Tyrosinkinasen. Die Substanz SU1498 ist ein selektiver Inhibitor der VEGF- Rezeptor-Tyrosinkinase KDR (flk-1, VEGFR2). Applikation von SU1498 unterdrückte die EPO-induzierte Schwellungshemmung (Abb. 19). Das deutet darauf hin, dass die Bindung von VEGF an den genannten Rezeptortyp für die Vermittlung des EPO-Effekts von Bedeutung ist.

Wurm et al. (2008) beschrieben für den VEGF- Signalweg eine Src-Aktivierung durch VEGF-Gabe. Deshalb wurde im Folgenden untersucht, ob Src-Kinasen auch in der EPO- Signaltransduktion von Bedeutung sind. Dabei wurden PP1- Analogon und SU6656, beides selektive Src- Tyrosinkinase-Inhibitoren, eingesetzt. Beide Inhibitoren waren in der Lage, den schwellungsinhibierenden Effekt von EPO zu unterdrücken (Abb. 19). Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass Src-Tyrosinkinasen in die durch EPO aktivierte Signalkaskade involviert sind. Da ein gleiches Ergebnis bei direkter Gabe von VEGF gefunden werden konnte (Wurm et al. 2008), kann vermutet werden, dass der durch VEGF vermittelte Signalweg auch durch Gabe von EPO aktiviert wird.

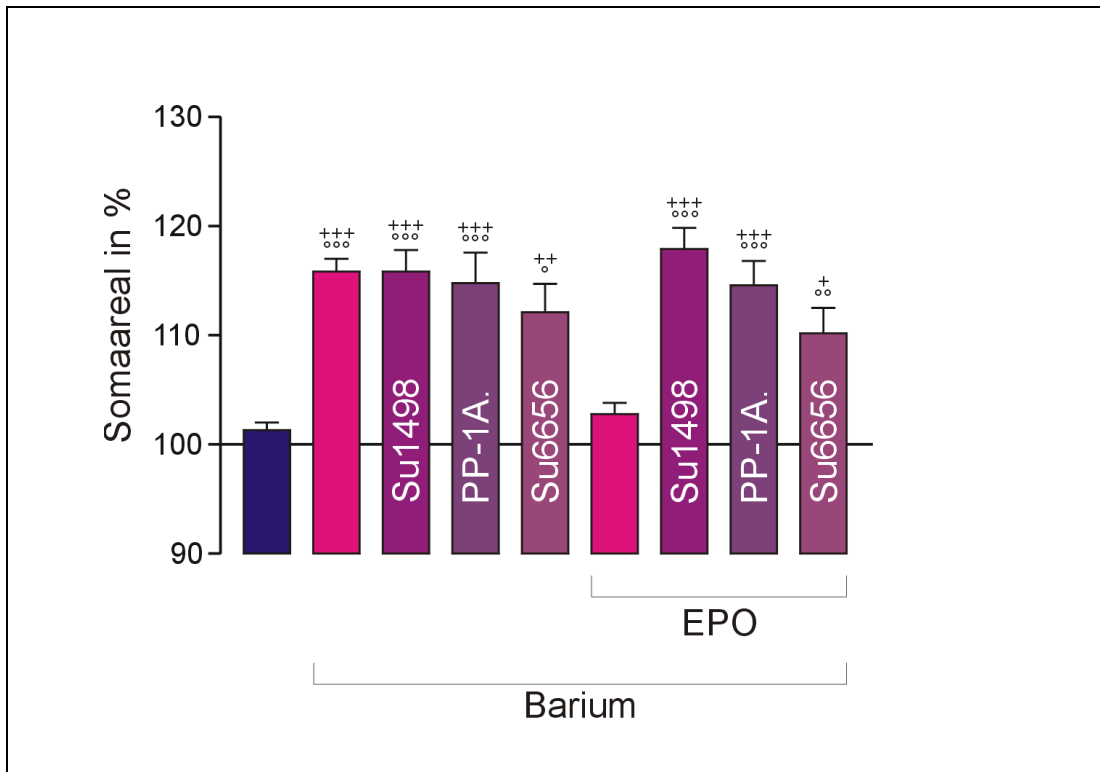


Abbildung 19: Durch den VEGF-Rezeptor aktivierte intrazelluläre Enzyme und ihre Rolle in der durch EPO ausgelösten Schwellungsinhibition. SU1498 ist ein potenter selektiver Inhibitor der VEGF-Rezeptor-Tyrosinkinase KDR. Es hatte keinen Einfluss auf die durch Barium induzierte Schwellung, hob jedoch den EPO- Effekt wieder auf. Auch PP-1Analogon (PP-1A.) und SU 6656, selektive Src-Kinaseinhibitoren, hoben die EPO-Wirkung auf, beeinflussten die Schwellung der Müllerzellsomata in hypotoner Bariumlösung jedoch nicht. (n=11-30)

3.4.7 Durch EPO induzierte VEGF-Ausschüttung

Der pharmakologische Nachweis der Aktivierung eines VEGF-Rezeptors (siehe 3.4.6) deutet darauf hin, dass durch Gabe von EPO eine autokrine Ausschüttung von VEGF im retinalen Gewebe induziert wird. Deshalb wurden die Schnitte mit neutralisierendem Antikörper gegen VEGF vorinkubiert und umspült. Der Zusatz von EPO zur antikörper-enthaltenden hypotonen Bariumlösung konnte dann keine Schwellungshemmung mehr induzieren. Der Antikörper veränderte das Schwellungsverhalten in hypotoner Bariumlösung nicht im Sinne einer Rezeptoraktivierung und löste in hypotoner EZL auch keine Schwellung aus. Durch Gabe von Glutamat konnte die Schwellung der Müllerzellsomata trotz Antikörperzugabe verhindert werden (Abb. 20). Dies weist darauf hin, dass EPO eine Ausschüttung von VEGF im Gewebe bewirkt, das durch den Antikörper gebunden werden kann. Die Freisetzung von Glutamat ist der VEGF-Wirkung innerhalb der Signalkaskade offensichtlich nachgeschaltet, da Glutamat trotz VEGF- Neutralisierung durch den Antikörper die Schwellung verhindern kann.

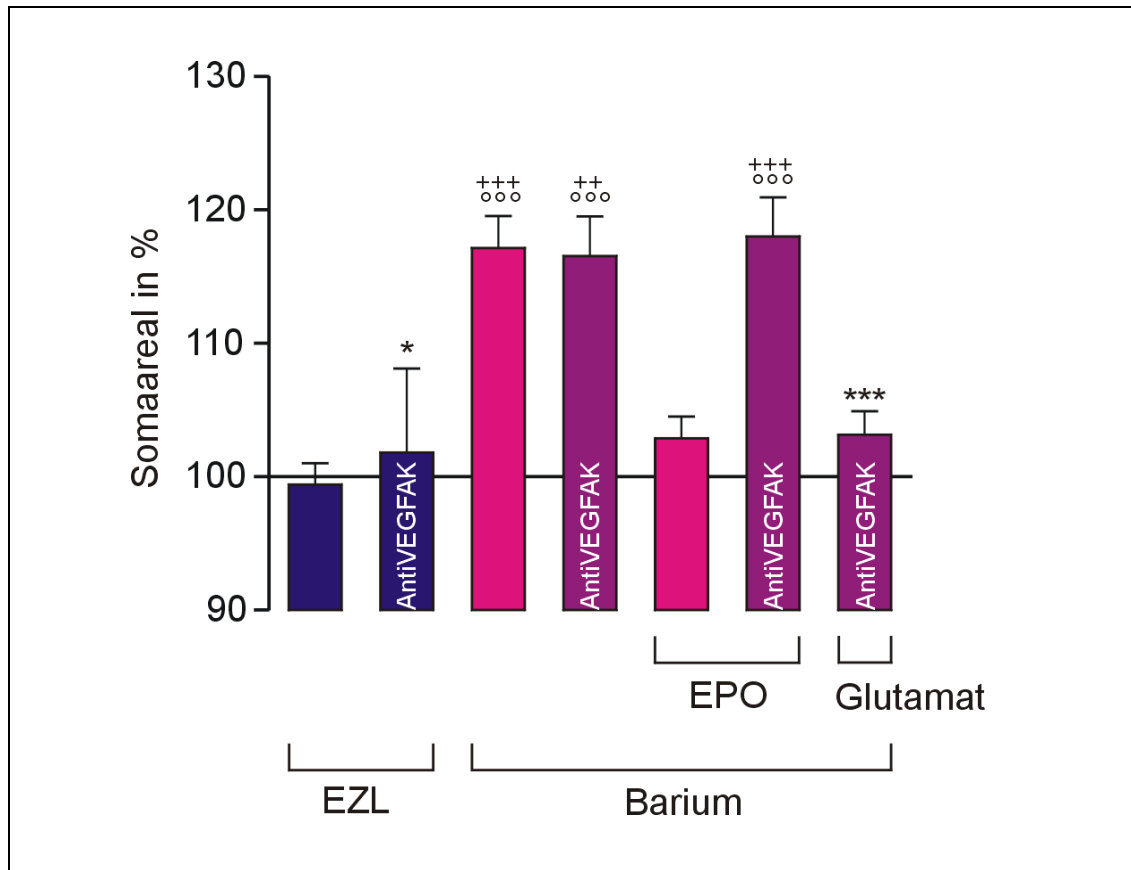


Abbildung 20: Die Ausschüttung von VEGF nach Gabe von EPO. Der neutralisierende anti-VEGF-Antikörper (AntiVEGFAK) rief in hypotoner EZL keine Schwellung der Zellsomata hervor. Durch Zugabe des Antikörpers in die Bariumlösung ergab sich kein Unterschied zur normalen Bariumgruppe. Der Antikörper hob die durch EPO vermittelte Schwellungsinhibition wieder auf. Glutamat hingegen konnte auch in Anwesenheit von AntiVEGFAK die Ba^{2+} -induzierte Schwellung unterdrücken. (n=6-18)

3.4.8 EPO- Rezeptorsignaltransduktion

Es ist bekannt, dass die Aktivierung des EPO-Rezeptors durch Bindung von EPO eine Stimulation der Janus-Tyrosinkinase 2 (Jak-2) induziert (Lacombe, Mayeux 1998). Um zu überprüfen, ob es auch beim Vorgang der EPO-induzierten Schwellungsinhibition zu dieser Rezeptoraktivierung kommt, wurde AG490 genutzt, welches ein Januskinase2-Inhibitor ist (Levitzki 2002). Es zeigte sich in den folgenden Experimenten mit AG490, dass die Hemmung der Januskinase 2 die EPO- Wirkung in hypotoner Bariumlösung aufhob, die Schwellung der Müllerzellsomata in hypotoner Bariumlösung aber nicht beeinflusste. Die Inhibition der Januskinase 2 hatte keinen Einfluss auf die schwellungsinhibierende Wirkung von VEGF und Glutamat. Beide Substanzen konnten die Schwellung trotz Anwesenheit von AG490 aufheben (Abb. 21). Daraus kann geschlussfolgert werden, dass die Januskinase 2 in die Signaltransduktion durch EPO nach der EPO-Rezeptoraktivierung aber vor der VEGF- bzw. Glutamat-Rezeptoraktivierung stattfindet.

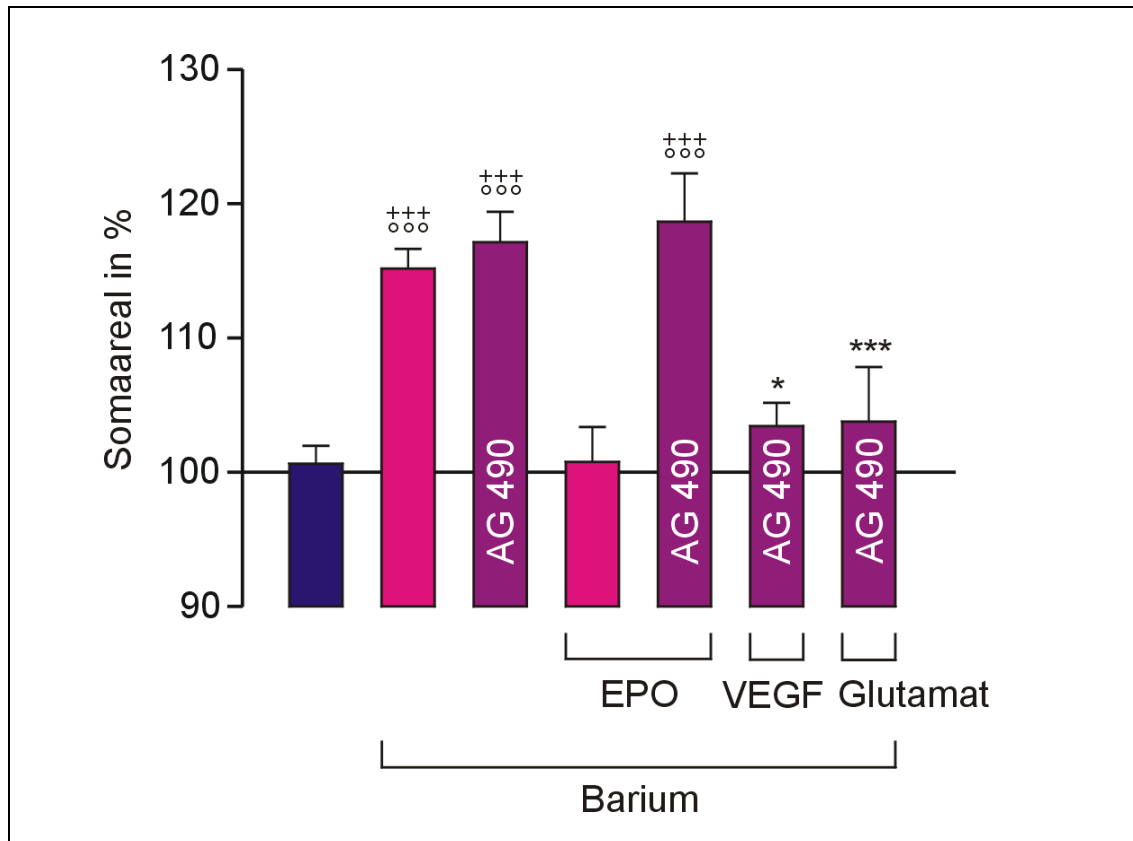


Abbildung 21: Die Beteiligung von Januskinase 2 an der schwellungsinhibierenden Wirkung von EPO. Der Januskinase-2-Inhibitor AG490 hat keinen Einfluss auf die durch Ba²⁺-induzierte Schwellung. Die durch EPO ausgelöste Schwellungshemmung wird durch AG490 wieder aufgehoben. Sowohl unter Zugabe von VEGF, als auch unter Zugabe von Glutamat zur AG490 enthaltenden hypotonen Bariumlösung war keine Schwellung der Müllerzellsomata zu beobachten. (n=5-21)

Allerdings ist AG490 auch ein Inhibitor der Kinase des Epidermalen Wachstumsfaktors (EGF-Kinase), weshalb zusätzlich mit dem selektiven Inhibitor der EGF-Kinase AG 1478 überprüft wurde, ob diese eine Rolle in der Signaltransduktion spielt. Dabei zeigte sich, dass AG1478 keinen Einfluss auf die durch EPO verursachte Schwellungsinhibition hatte. Auch die schwellungshemmende VEGF-Wirkung wurde durch AG1478 nicht beeinflusst. Der Zusatz von AG1478 hatte keinen Einfluss auf das Schwellungsverhalten in hypotoner Extrazellulärlösung und hypotoner Bariumlösung. Damit kann davon ausgegangen werden, dass die EGF-Kinase keine Rolle im Signalweg spielt und durch AG490 ausschließlich Jak-2 inhibiert wird (Abb. 22).

Für neuronale Progenitorzellen beschrieben Wang et al. (2008) eine durch EPO induzierte VEGF-Freisetzung. Diese konnte durch den MAP-Kinaseinhibitor U0126 verhindert werden. Deshalb sollte auch für die Müllerzellschwellungsinhibition untersucht werden, ob MAP-Kinasen in diesem Prozess eine Rolle spielen. Dazu wurde der Blocker PD 98059 eingesetzt. Dieser hatte keinen Einfluss auf das Schwellungs

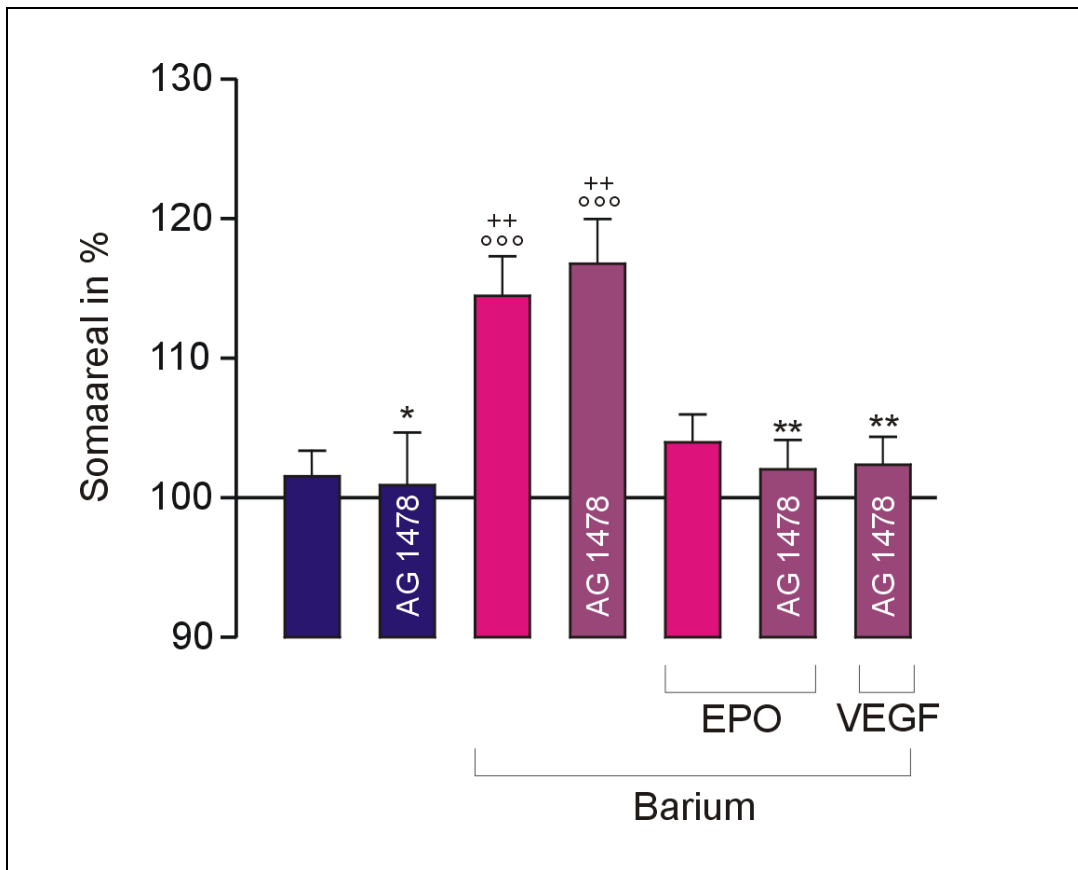


Abbildung 22:: Einfluss von EGF-Kinase auf das Müllerzellschwellungsverhalten.

Der Inhibitor der EGF-Rezeptorkinase AG 1478 hatte keinen Einfluss auf das Schwellungsverhalten der Zellen in hypotoner Extrazellulärlösung und hypotoner Bariumlösung. Des Weiteren wurden sowohl EPO als auch VEGF- Wirkung nicht durch Zugabe des Inhibitors beeinflusst.

verhalten der Zellen in hypotoner Extrazellulärlösung und hypotoner Bariumlösung. Jedoch verhinderte PD 98059- Zugabe den schwellungsinhibierenden EPO- Effekt. Die schwellungshemmende Wirkung von VEGF und Glutamat wurden jedoch nicht beeinträchtigt, was vermuten lässt, dass eine MAP-Kinaseaktivierung für einen Signalschritt notwendig ist, der nach der Aktivierung des EPO-Rezeptors, aber vor der Aktivierung von VEGF- und Glutamatrezeptoren stattfindet (Abb. 23). Es könnte sich um eine Beeinflussung der VEGF-Freisetzung handeln.

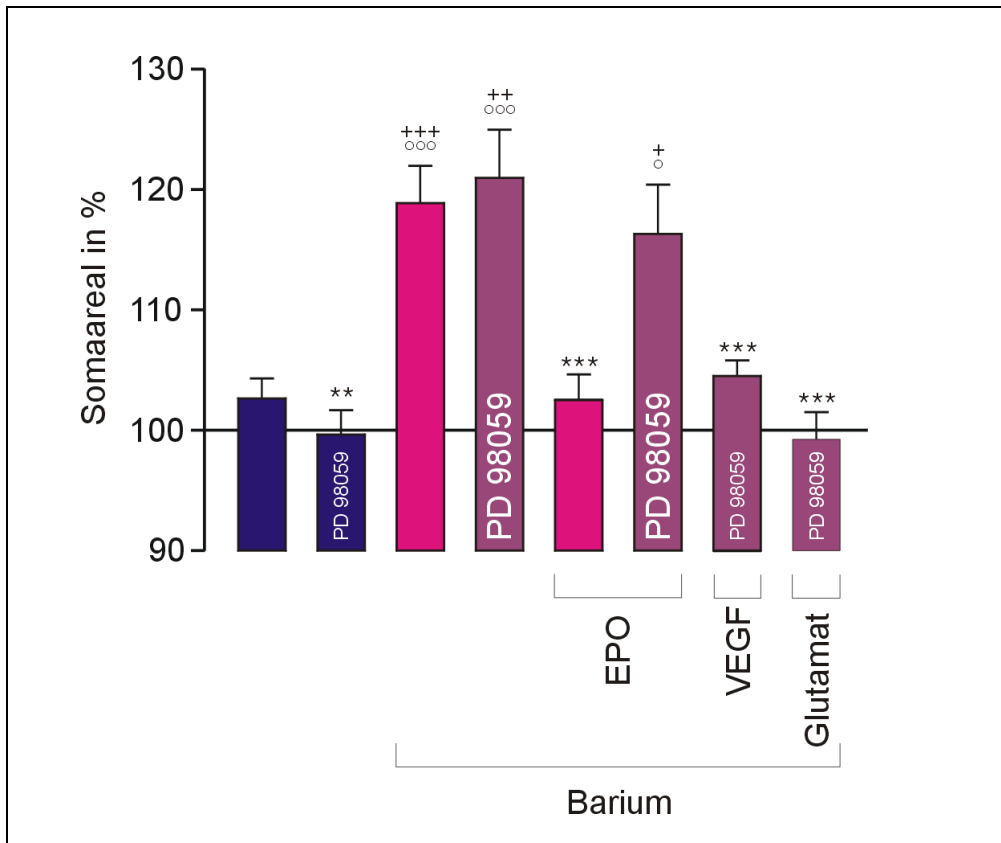


Abbildung 23: Die Beteiligung von MAP-Kinasen an der Schwellungsinhibition durch EPO.

Die Zugabe des MAP-Kinaseninhibitors PD 98059 hatte keinen Einfluss auf das Schwellungsverhalten in hypotoner Extrazellulärlösung. Auch die Schwellung in hypotoner Bariumlösung wurde durch PD 98059 nicht verändert. Die schwellungshemmende EPO-Wirkung wurde durch MAP-Kinaseninhibition aufgehoben, nicht jedoch die VEGF- und Glutamatwirkung. (n:5-17)

3.5 Die Lokalisierung von EPO- Rezeptoren im Netzhautschnitt und auf isolierten Müllerzellen

Um bestimmen zu können, wo der EPO-Rezeptor innerhalb der Netzhaut lokalisiert ist, wurde eine Immunfluoreszenzfärbung am Retinaschnitt angefertigt (Abb. 24). Dabei zeigte sich ein Signal für den EPO-Rezeptor in allen inneren Retinaschichten bis zur inneren nukleären Schicht. Eine deutliche Färbung wiesen Ganglienzellen, aber auch Neuronen der inneren nukleären Schicht auf. Außerdem zeigten die Photorezeptoraußensegmente eine starke Färbung. Obwohl die Schnitte in der Zweitfärbung gegen Glutaminsynthetase markiert wurden, welche in der Netzhaut nur von Müllerzellen exprimiert wird (Linser, Moscano 1979), war eine eindeutige Zuordnung des EPO-Rezeptors zu Müllerzellen nicht möglich. Deshalb wurden im Weiteren isolierte Müllerzellen gefärbt. Die immunocytochemische Färbung mit anti-Glutaminsynthetase-Antikörpern ergab eine deutliche Markierung der gesamten Zelle mit Soma und den zwei Stammfortsätzen. An den Stammfortsätzen waren vereinzelt Seitenfortsätze erkennbar, die in der intakten Netzhaut in den plexiformen Schichten

liegen. Auch der zum Glaskörper gewandte Endfuß ließ sich abgrenzen. In vielen Müllerzellen war eine Immunreaktivität gegen den EPO-Rezeptor sichtbar. Dabei zeigte sich ein typisches Verteilungsmuster der Färbung auf den inneren Stammfortsätzen in Somanähe (Abb. 25), also in einem Bereich, der sich *in vivo* innerhalb der inneren nukleären Schicht befindet. Vereinzelt erstreckte sich die Färbung sogar bis auf das Müllerzellsoma selbst (s. Abb. 25).

Es konnte gezeigt werden, dass Müllerzellen aus Netzhäuten diabetischer Ratten bereits ohne Gabe von Barium-Ionen schwellen, und dass EPO diese Schwellung ebenfalls inhibiert (Krügel et al. 2010). Um zu überprüfen, ob die Expression des EPO-Rezeptors in der diabetischen Netzhaut verändert ist, wurden im Folgenden Antikörperfärbungen gegen den EPO-Rezeptor und Glutaminsynthetase an Netzhäuten und isolierten Zellen von diabetischen Ratten durchgeführt. In den Schnittfärbungen der diabetischen Tiere (Abb. 24) ist die Dicke der gesamten Netzhaut geringer als bei den unbehandelten Tieren, wobei sich besonders die innere plexiforme Schicht, die äußere Körnerschicht und die Photorezeptorschicht dünner darstellen. Weiterhin scheint die Intensität der Glutaminsynthetasefärbung vermindert, vor allem in der äußeren Körnerzellschicht. Der EPO-Rezeptor zeigt wiederum seine typische Lokalisation in allen inneren Retinaschichten bis zur inneren nukleären Schicht. Die Photorezeptoraußensegmente sind kaum auf EPO-Rezeptor angefärbt. Im Vergleich zur unbehandelten Netzhaut fällt bei den diabetischen Tieren eine Überlagerung der Glutaminsynthetase- und EPO-Rezeptorfärbung entlang der Blutgefäße (siehe Vergrößerung Abb. 24) auf. Dies könnte ein Indiz für eine gesteigerte Expression von EPO-Rezeptoren an Kontaktstellen von Müllerzellen zu retinalen Blutgefäßen unter diabetischen Stoffwechselverhältnissen sein. Da für die Verteilung des EPO-Rezeptors auf Müllerzellen in den Schnitten keine genaue Aussage getroffen werden konnte, wurden hierzu wiederum isolierte Zellen gefärbt.

Die isolierten Müllerzellen der diabetischen Tiere zeigen eine verminderte Immunfluoreszenz auf die EPO-Rezeptorfärbung. Nur bei vereinzelten Zellen stellt sich eine punktförmige, clusterartige Fluoreszenz im Bereich der Endfüße dar. Alle übrigen weisen keine fluoreszenzmikroskopisch detektierbare Markierung auf. Dies deutet auf eine verminderte Zahl der EPO-Rezeptoren auf Müllerzellen von diabetischen Tieren hin, schließt die Expression jedoch nicht völlig aus. Denn es muss damit gerechnet

Ergebnisse

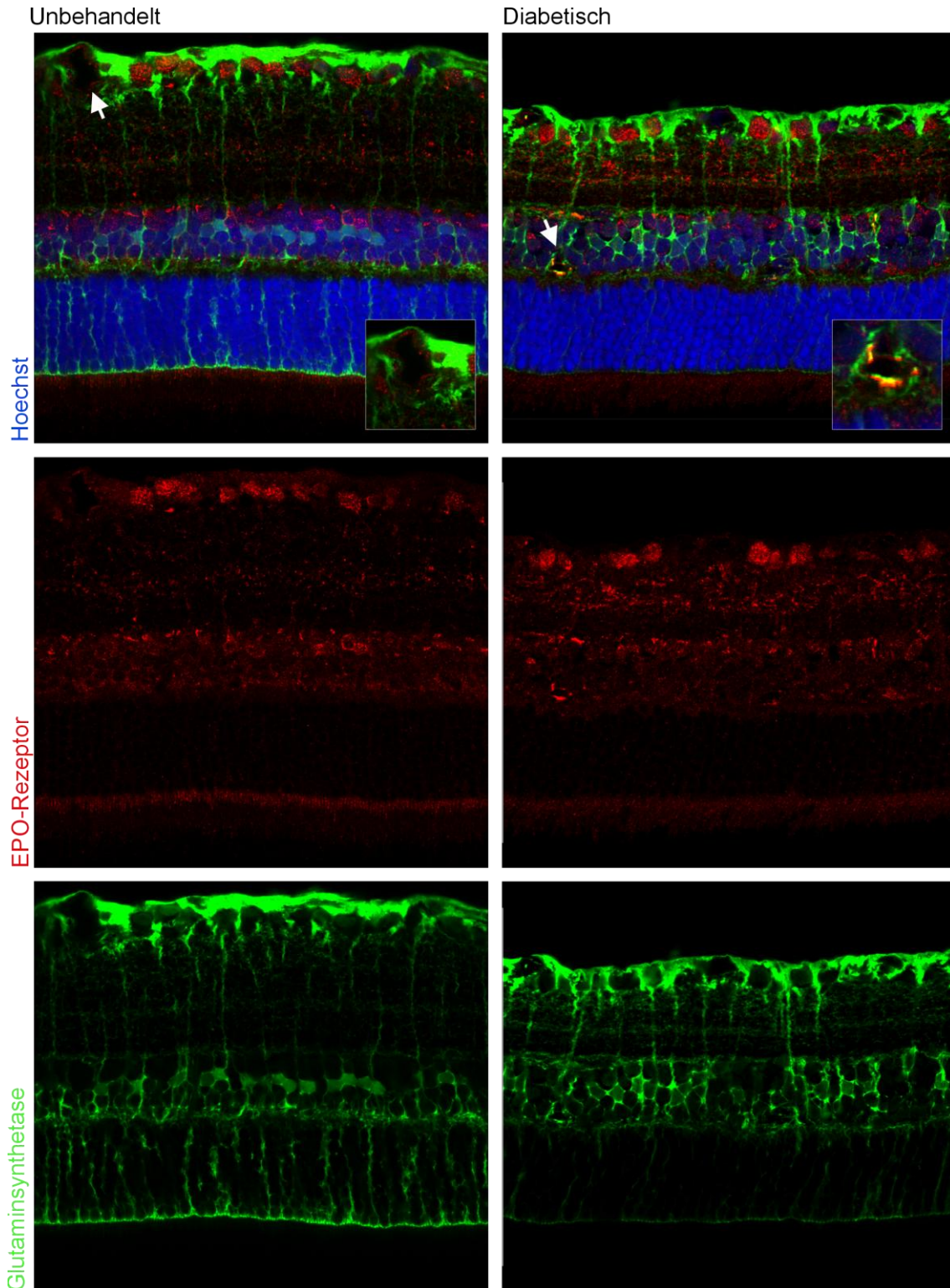


Abbildung 24: Die Darstellung von EPO-Rezeptoren im Retinaschnitt un behandelter und diabetischer Tiere. Rot ist der EPO-Rezeptor (EPOR) und grün das Enzym Glutaminsynthetase (GS) dargestellt. Die blaue Färbung (Hoechst 33258) markiert die Zellkerne. Die Pfeile weisen auf Blutgefäße der vaskularisierten Rattennetzhaut. Die diabetische Netzhaut ist dünner und schwächer auf GS angefärbt als die un behandelte.

Die EPO-Rezeptoren haben im Vergleich zwischen diabetischer und un behandelter Netzhaut eine weitgehend identische Verteilung, eine Ausnahme bildet lediglich die Kolokalisation des EPO-Rezeptors und der GS entlang von Blutgefäßen, die in der diabetischen Netzhaut auftritt (Pfeilspitzen), bei den un behandelten Tieren aber fehlt. Der Bereich, auf den die linke Pfeilspitze in der diabetischen Netzhaut hinweist, ist im eingesetzten Bild stärker vergrößert dargestellt.

Ergebnisse

werden, dass bei der Isolationsprozedur kleinere Seitenausläufer der Zellen abreißen. Das würde erklären, dass die Doppelmarkierung für EPO-Rezeptor und GS, die im Schnittpräparat zu sehen ist (Abb. 24), an isolierten Zellen nicht gefunden wurde (Abb. 25).

In der Glutaminsynthetasefärbung weisen die Zellen keine markanten morphologischen Unterschiede zu den Zellen der unbehandelten Tiere auf.

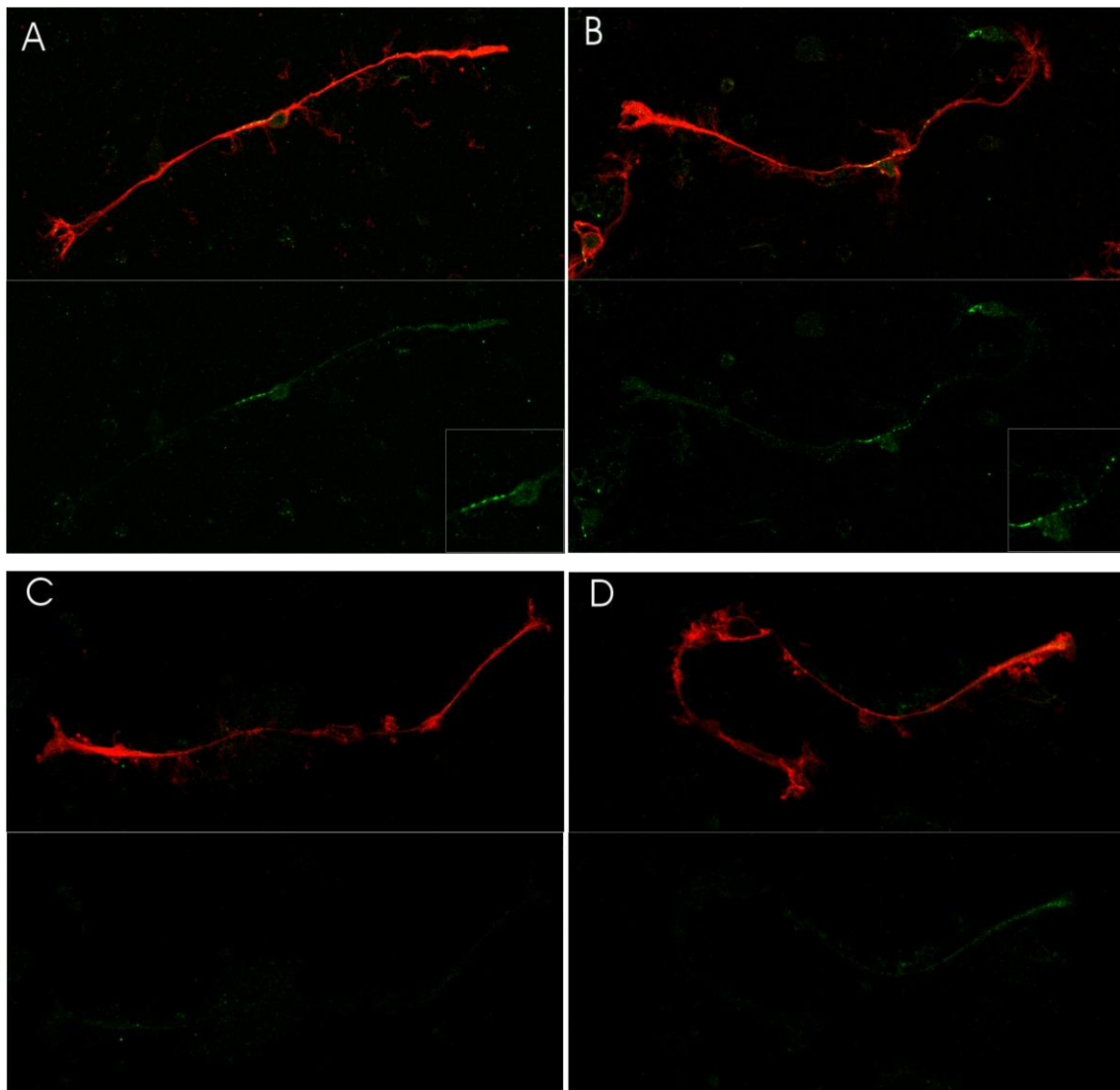


Abbildung 25: Lokalisation des EPO-Rezeptors auf isolierten Müllerzellen. Die oberen zwei Bilder zeigen isolierte Müllerzellen unbehandelter Ratten, die mit Antikörpern für Glutaminsynthetase (GS), rot und EPO-Rezeptor (EPOR), grün gefärbt wurden. Unter den unbehandelten Zellen A und B sind jeweils die EPO-Rezeptorfärbungen allein dargestellt. Die Kästchen zeigen eine Vergrößerung des Somas und der somanahen Fortsätze. Auf den unteren Abbildungen (C, D) befinden sich die gleichen Färbungen für diabetische Tiere. Hier ist die EPO-Rezeptormarkierung nicht oder nur vereinzelt an den Endfüßen der Müllerzellen sichtbar (D).

4 Diskussion

4.1 Die durch Bariumionen induzierte Müllerzellschwellung als Pathologiemodell

In der vorliegenden Arbeit wurde das Schwellungsverhalten von Müllerzellen in Netzhäuten der Ratte nach Blockierung der K^+ -Kanäle mit Ba^{2+} untersucht. Dabei zeigte sich in hypotoner Lösung eine Schwellung der Müllerzellsomata.

Folgende Überlegungen liegen diesem Modell zu Grunde: Bei neuronaler Aktivität würden sich ohne entsprechende Regulationsmechanismen erhöhte Mengen von Wasser und Kaliumionen im Extrazellärraum ansammeln (Dmitriev et al. 1999). Müllerzellen sind entscheidend an der räumlichen Umverteilung dieses überschüssigen Wassers und Kaliums beteiligt. Der Befund, dass Kir4.1-Kanäle und Aquaporin-4 (AQP4) an glialen Ausläufern um Blutgefäße und an Müllerzellendfüßen, die die Netzhaut zum Glaskörper hin abgrenzen, kolokalisiert sind (Nagelhus et al. 1999, Iandiev et al. 2006), deutet darauf hin, dass an die Kaliumionenbewegungen Wasserströme gekoppelt sind. Kaliumionen und das ihnen aus osmotischen Gründen nachströmende Wasser werden dabei in den plexiformen Schichten von den Müllerzellen aufgenommen. Beides wird dann von diesen Zellen in Richtung Blutgefäße, Glaskörper und Subretinalraum wieder abgegeben (Abb. 26; Newman et al. 1984, Reichenbach et al. 1992).

Bei der Ratte kommt es nach retinaler Ischämie (Pannicke et al. 2004) und bei diabetischer Retinopathie (Pannicke et al. 2006) zu einer Abnahme der Kaliumströme, zu einer verminderten Expression und einem Verlust der oben beschriebenen, typischen Lokalisation der Kir4.1-Kanäle. Diese Befunde lassen vermuten, dass Wasser- und Ionentransportprozesse in den Müllerzellen unter pathologischen Bedingungen beeinträchtigt sind. Die im Pathologiemodell stattfindende Reduktion der Kaliumströme kann experimentell auch durch Blockade der Kir-Kanäle mit Ba^{2+} -Ionen erreicht werden (Newman 1989, Pannicke et al. 2005a). Damit kann im Tiermodell eine konkrete funktionelle Störung nachgeahmt werden, die bei pathologischen Veränderungen der Netzhaut in Müllerzellen auftritt (Pannicke et al. 2004, 2005b). Derartige Veränderungen in der Müllerzellfunktion bei Netzhauterkrankungen können unter Umständen schon zu frühen Zeitpunkten im Krankheitsverlauf auftreten (Zhu et al. 2008; Juen, Kieselbach 1990).

Bei bestimmten Netzhauterkrankungen, so z.B. der diabetischen Retinopathie, kann ein Zusammenbruch der Blut-Retina-Schranke zu osmotischem Stress im retinalen Gewebe

führen, was eine Voraussetzung für das Entstehen eines extrazellulären oder auch vasogen genannten Ödems sein kann (Marmor 1999, Leal et al. 2005). Um Bedingungen zu erzeugen, die einem Ödem entsprechen, wurden die Retinaschnitte deshalb mit hypotoner Extrazellulärlösung umspült. Die Ödembildung *in vivo* scheint zwar durch erhöhte intrazelluläre Ionenkonzentrationen zu Stande zu kommen (Liang et al. 2007), da jedoch intrazelluläre Ionenkonzentrationen schwer kontrollierbar sind, wurde im Rahmen der Experimente der osmotische Gradient vorzugsweise durch die Herabsetzung der gut regulierbaren extrazellulären Ionenkonzentration erzeugt. Aufgrund dieser Überlegungen wurden Schwellungsexperimente in Anwesenheit von Barium-Ionen durchgeführt, wodurch auf die Induktion von Netzhauterkrankungen am lebenden Tier weitgehend verzichtet werden konnte.

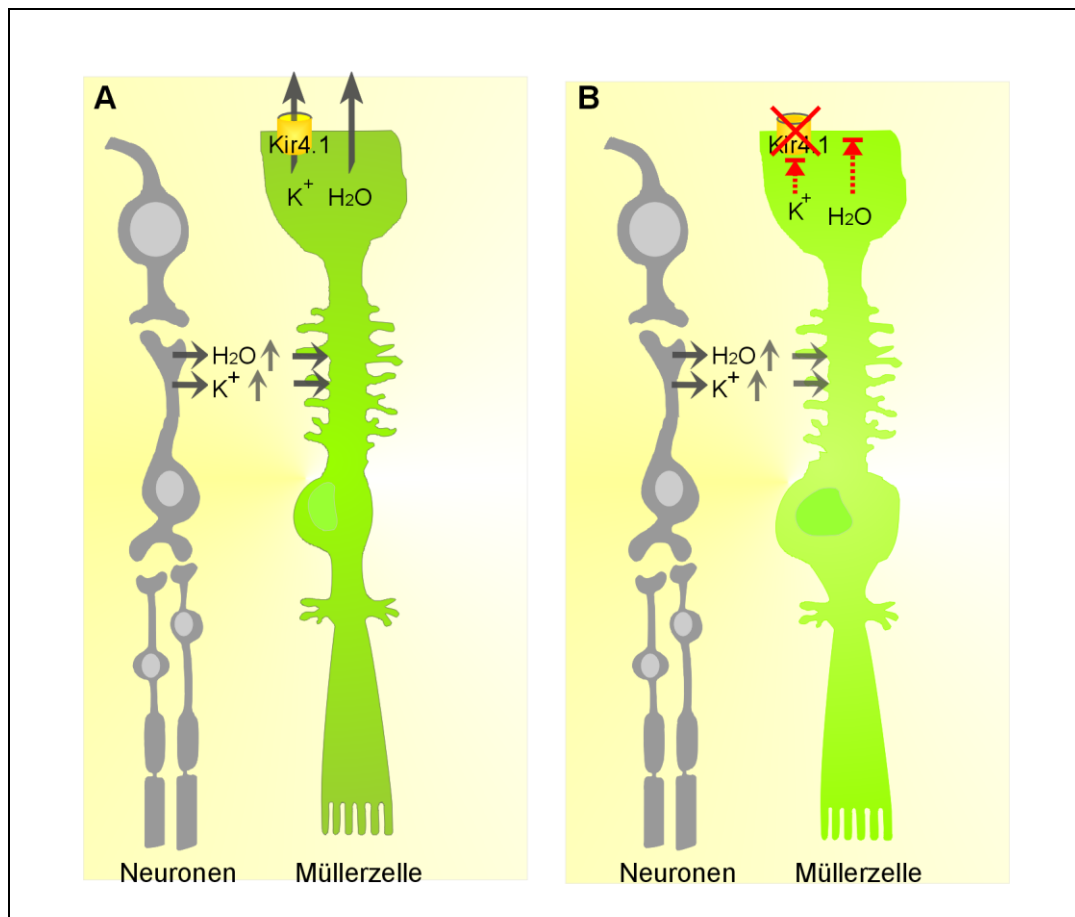


Abbildung 26: Schema der Kalium- und Wasserpufferung in der gesunden und der pathologisch veränderten Retina.

Abbildung A zeigt den osmotischen Ausgleich in der gesunden Retina. Ein Überschuss an Wasser und Kaliumionen wird aus den plexiformen Schichten aufgenommen und entlang der Müllerzellfortsätze geleitet.

Abbildung B stellt eine pathologisch veränderte Retina dar. Hierbei kommt es zur Herunterregulation der Kir4.1-Kanäle am Müllerzellendfuß und an den Blutgefäßen. Dadurch kann das aus den plexiformen Schichten aufgenommene Wasser nicht abgegeben werden und führt zur Schwellung der Müllerzelle, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durch Messung der Schwellung des Somas erfasst wurde. Durch Barium lässt sich diese Pathologie simulieren.

4.2 Die EPO-Wirkung auf die Schwellung von Müllerzellen

Aus der Literatur ist bekannt, dass posttraumatisches (Verdonck et al. 2007) und kälteinduziertes (Okutan et al. 2008) Hirnödeme bei Ratten durch EPO dauerhaft reduziert werden können. In der Retina zeigte EPO einen protektiven Effekt bei vasogenem Ödem durch Verhinderung von Endothelzelltod und Verminderung der Permeabilität der Blut-Retina-Schranke (Zhang et al., 2008). Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass EPO auch ein zytotoxisches Ödem der retinalen Müllerzellen durch Stimulation der gliagestützten Volumenregulation verhindern kann. Normalerweise werden die neuroprotektiven Effekte des EPO durch Gentranskription vermittelt (Marti 2004). Die Schwellungshemmung ist allerdings ein akuter Vorgang, für den eine Regulation auf genetischer Ebene keine Rolle spielt. Auch Gunnarson et al. (2009) konnten an Hirnastrozyten zeigen, dass EPO die Gliaschwellung akut reduzieren kann. Für die Inhibition der Schwellung bei Astrozyten wurde EPO in Konzentrationen von 10^{-7} g/ml eingesetzt, was einer molaren Konzentration von 5,4 nM entspricht (Gunnarson et al. 2009). Weiterhin ist für Astrozyten eine Affinität für EPO zu seinem Rezeptor von 1-10 nM (Brines, Cerami 2005) beschrieben. Diese Konzentrationen befinden sich in derselben Größenordnung, wie die in oben stehenden Experimenten zur Schwellungsinhibition bei Müllerzellen verwendete Konzentration von 1 nM. Die EC_{50} für die Schwellungshemmung lag bei 7 pM. Protektive Effekte des EPO auf Neuronen wurden mit Konzentrationen von 1 pM (Koshimura et al. 1999) und 3 pM (Morishita et al. 1997) beobachtet. Für diese auf gen-regulatorischen antiapoptotischen Effekten beruhenden Wirkungen scheinen also geringere Konzentrationen als für die Kurzzeitwirkungen von Nöten zu sein. Dies könnte daran liegen, dass für Kurzzeit- und Langzeitwirkung unterschiedliche Signalwege bzw. Endpunkte wichtig sind.

4.3 Der grundlegende Signalweg der Schwellungsinhibition wird durch EPO aktiviert

Um die Wirkung von EPO unter pathologischen Bedingungen zu untersuchen, wurden wie oben dargestellt die Kaliumkanäle mit Bariumionen blockiert (Pannicke et al. 2005a). Damit ist die normale Volumenregulation der Müllerzellen gestört (Abb. 26B) und andere Wege des Flüssigkeitstransports müssen zur Ödemauflösung aktiviert werden. Für EPO konnte gezeigt werden, dass dieser Wassertransport wahrscheinlich osmotisch an Kalium- und Chloridbewegungen gekoppelt ist. Dabei spielen barium- und arachidonsäureinsensitive Kaliumkanäle, von Skatchkov et al. (2006) als Zwei-

Poren-K⁺-Kanäle beschrieben, und womöglich volumensensitive Chloridkanäle eine Rolle (Abb. 27). Eine Verhinderung der Zellschwellung durch Öffnung von Zwei-Poren-Kaliumkanälen wurde bereits für das Zellschwellungsverhalten von Ehrlich-Tumorzellen (Hoffmann, Hougaard 2001) und hippocampalen Astrozyten beschrieben (Päsler et al. 2007). Weiterhin konnte an Astrozyten eine Zellschwellung durch Zugabe der Chloridkanalblocker NPPB und SITS beobachtet werden (Crèpel et al. 1998). Im Gegensatz dazu stehen die Untersuchungen von Gunnarson et al. (2008). Es konnte nachgewiesen werden, dass Glutamat durch Aktivierung von metabotropen Glutamatrezeptoren eine Schwellung von Astrozyten in frischen hippocampalen Schnitten hervorruft. Als Ursache dafür wurde eine Erhöhung der Wasserpermeabilität von Aquaporin-4 beschrieben (Gunnarson et al., 2008). Dieser Glutamateffekt konnte durch EPO unterdrückt werden (Gunnarson et al., 2009). Auf Grundlage der hier vorgestellten Ergebnisse kann nicht ausgeschlossen werden, dass EPO auch bei Müllerzellen die Permeabilität des Aquaporin-4 moduliert. Allerdings wurde bereits gezeigt, dass die Volumenregulation von retinalen Gliazellen und Hirnastrozyten in unterschiedlicher Weise von der Kaliumkanalpermeabilität abhängig ist: Kaliumströme durch Kir-Kanäle scheinen für retinale Glia bedeutender zu sein als für Hirnastrozyten (Hirrlinger et al., 2008). Vielleicht spielt auch der Efflux von Aminosäureosmolyten bei Hirnastrozyten (Kimmelberg et al. 1990; Nedergaard et al. 2002) eine wichtigere Rolle als in retinalen Gliazellen. Dennoch sollte der Einfluss von EPO auf die Permeabilität von Aquaporin-4 auf Müllerzellen in weiteren Experimenten genauer bestimmt werden.

Für die Schwellungshemmung durch EPO konnte in den hier vorgestellten Experimenten gezeigt werden, dass es dabei zur Aktivierung von A₁-Rezeptoren und nachfolgend von Proteinkinase A und Phosphatidylinositol3-Kinase kommt. Diese Schritte wurden von Uckermann et al. (2005) als der Kalium –und Chloridkanalöffnung vorangestellt beschrieben. Das für die A₁-Rezeptoraktivierung benötigte Adenosin wird von Müllerzellen über Nucleosidtransporter freigesetzt und ist Teil einer endogen-autokrinen Signalkaskade auf Müllerzellen (Wurm et al. 2008) (Abb. 28). Die der A₁-Rezeptoraktivierung vorangestellte Adenosinfreisetzung durch Transporter konnte auch für EPO nachgewiesen werden. Adenosin ist ein wichtiges Neuroprotektiv in der Retina (Larsen and Osborne, 1996; Ghiardi et al., 1999), inhibiert neuronale Aktivität und Transmitterfreisetzung und bewirkt retinale Hyperämie (Ostwald et al., 1997; Housley et al., 2009). Es ist beschrieben, dass von Müllerzellen in die innere Körnerschicht abgegebenes ATP extrazellulär zu Adenosin abgebaut werden kann (Newman 2003).

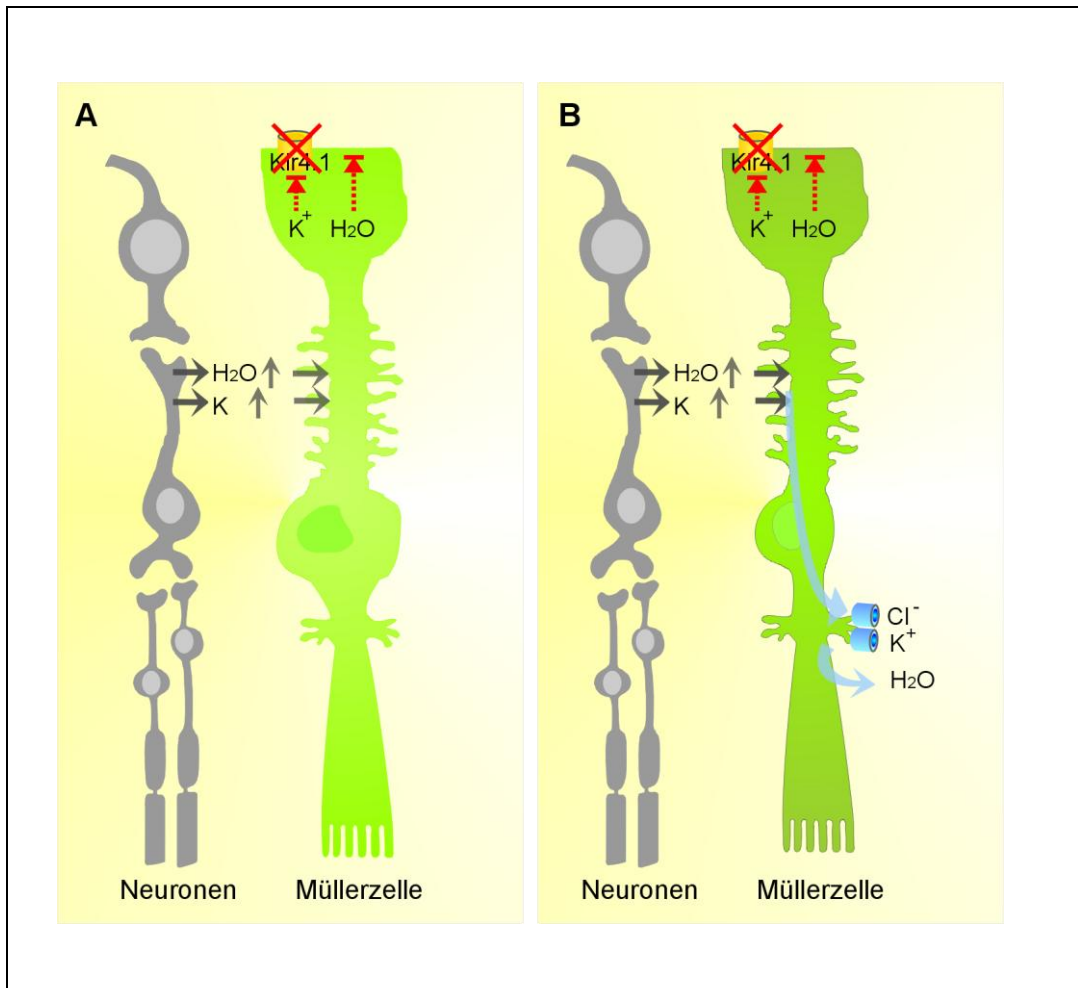


Abbildung 27: Die Wiederherstellung der Volumenregulation.

Abbildung A zeigt die gestörte Volumenregulation, die eine Zellschwellung verursacht. Abbildung B zeigt, dass durch die EPO-Zugabe Kalium- und Chloridkanäle geöffnet werden. Den durch diese Kanäle abtransportierten Ionen folgt aus osmotischen Gründen Wasser, wodurch eine Zellschwellung verhindert wird. Damit verbunden ist der Abtransport des überschüssigen Kaliums aus den plexiformen Schichten.

Diese Spaltung scheint bei der Signalkaskade zur Schwellungsinhibition jedoch keine Rolle zu spielen, sondern wie schon in den Ergebnissen beschrieben scheint die Freisetzung aus Transportern von Bedeutung zu sein.

Im Rahmen der purinerger Signalkaskade des schwellungsinhibierenden EPO-Effekts ist die $P2Y_1$ -Rezeptoraktivierung und die vorausgehende autokrine ATP-Abgabe durch Müllerzellen (Wurm et al. 2008) bedeutsam. $P2Y_1$ -Rezeptoren sind auf Müllerzellen lokalisiert (Ward, Flechter 2009) und haben bei der Ratte schon kurz nach Geburt eine funktionelle Bedeutung, unter anderem für die Schwellungsinhibition (Wurm et al. 2009b). Von Müllerzellen abgegebenes ATP kann extrazellulär durch eine NTPDase in ADP umgewandelt werden. Iandiev et al. (2007) beschrieben die NTPDase2 als dominierendes nukleotidabbauendes Enzym der Müllerzellen in der Nagerretina. Die NTPDase2 setzt bevorzugt ATP zu ADP um. ADP wiederum kann den $P2Y_1$ -Rezeptor

effizienter als ATP aktivieren (Burnstock 2006) (Abb. 28). Dieser Schritt ist offensichtlich essentiell, denn Hemmung der NTPDase2 mit ARL67156 unterbricht die Signalkaskade.

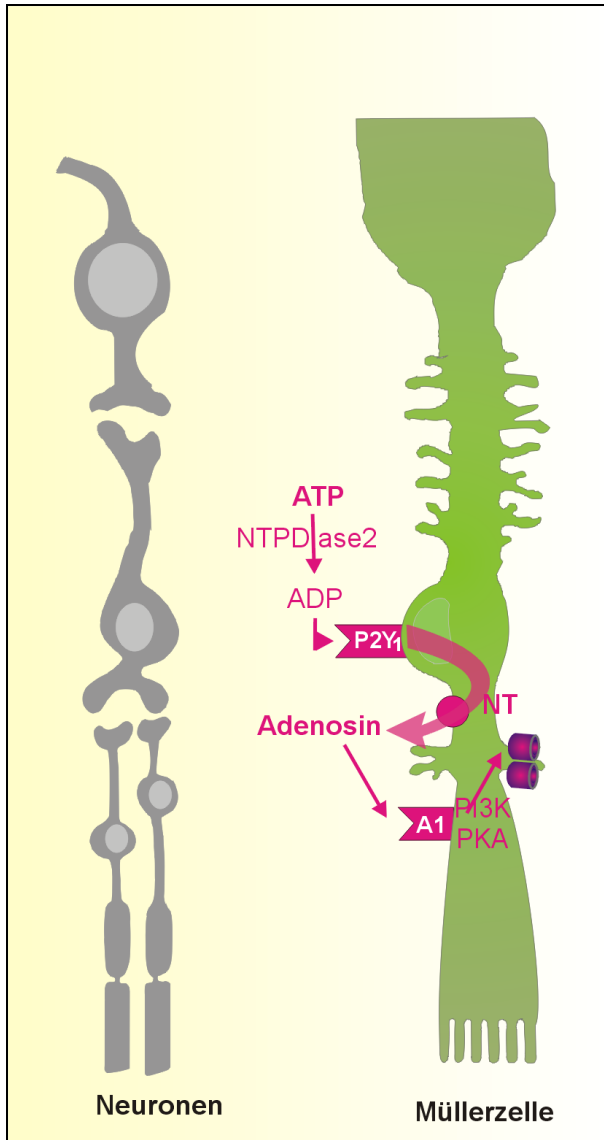


Abbildung 28: Der purinerge Teil der EPO-Signalkaskade.

Die Aktivierung der arachidonsäure- und bariuminsensitiven Kalium- und Chloridkanäle verläuft über eine P2Y₁-Rezeptoraktivierung, die zur Adenosinausschüttung über einen Nukleosidtransporter (NT) führt. Dieses bewirkt durch A₁-Rezeptoraktivierung eine Aktivierung der Phosphatidylinositol3-Kinase (PI3K) und der Proteinkinase A (PKA), die letztendlich die Kalium- und Chloridkanalöffnung induzieren.

Als Auslöser der ATP-Freisetzung beschrieben Wurm et al. (2008) eine Glutamatausschüttung von Müllerzellen mit nachfolgender autokriner Glutamatrezeptoraktivierung. In der vorliegenden Arbeit konnte auch für die durch EPO induzierte Schwellungsinhibition die Bedeutung der Aktivierung von metabotropen Glutamatrezeptoren der Gruppe I und II nachgewiesen werden. Die in den vorliegenden Ergebnissen gezeigte Beeinflussung des EPO-Effekts durch Inhibition des

Calciumanstiegs, des Natrium- und Calciumeinstroms, der Proteinkinase C und der Phospholipase C und schließlich der vesikulären Beladung lassen folgenden Ablauf des Geschehens vermuten: Durch Aktivierung (spannungsabhängiger) Natriumkanäle könnte eine Änderung des Müllerzellmembranpotentials erfolgen und eine konsekutive Aktivierung spannungsabhängiger Calciumkanäle auslöst werden. Dadurch kommt es zu einem Einstrom von Calcium. Andererseits scheint durch eine Aktivierung der Phospholipase C mit nachfolgender Bildung von Inositoltriphosphat auch eine Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern ausschlaggebend zu sein. Im Folgenden bewirkt der intrazelluläre Calciumanstieg eine Proteinkinase-C-Aktivierung, welche bei einer Vielzahl von Zelltypen die Exozytose durch Phosphorylierung moduliert (Morgan et al. 2005). Letztendlich erfolgt eine vesikuläre Freisetzung von Glutamat. Aus den vorliegenden Daten kann nicht eindeutig geschlossen werden, welche Zellen das Glutamat freisetzen, allerdings legen Experimente von Wurm et al. (2008) an isolierten Müllerzellen die Vermutung nahe, dass die Müllerzellen selbst Glutamat freisetzen könnten. Des Weiteren konnte von Bringmann et al. (2000a, 2000b) beim Menschen und beim Kaninchen und von Felmy et al. (2001) bei der Ratte die funktionelle Expression spannungsabhängiger Natrium- und Calciumkanäle gezeigt werden. Ein Beitrag von neuronal freigesetztem Glutamat kann jedoch nicht ausgeschlossen werden (Abb. 29). Auch in Astrozyten konnte nachgewiesen werden, dass es eine von Calciumanstiegen (Parpura et al. 1994, Pasti et al. 2001) und Phospholipase C-Aktivierung abhängige (Jeremic et al. 2001) Glutamatfreisetzung gibt, so dass dies eine verbreitete Gliazellfähigkeit zu sein scheint. Darüber hinaus konnten Pasti et al. (2001) die astrozytäre Glutamatausschüttung durch Hemmer der Exozytose wie Bafilomycin A1 und Tetanustoxin inhibieren.

Der hier aufgeführte Signalweg über Glutamat-, P2Y₁- und A₁-Rezeptoren stellt womöglich die gemeinsame Endstrecke einer Kaskade dar, die durch verschiedene Wachstumsfaktoren aktiviert wird. So wurde er schon für ANP (Kalisch et al. 2006), HB-EGF (Weuste et al. 2006), NPY (Uckermann et al. 2006) und VEGF (Wurm et al. 2008) beschrieben. In Zukunft könnte untersucht werden, ob verschiedene Substanzen in verschiedenen Pathologien eine quantitativ unterschiedliche Ausschüttung von Transmittern wie Glutamat, ATP oder Adenosin bewirken, um die Bedeutung dieses Kaskadensystems besser einordnen zu können. Auch ist es wichtig, mit spezifischen Methoden eine gliale vesikuläre oder transporterabhängige Ausschüttung von Substanzen sicherer nachzuweisen.

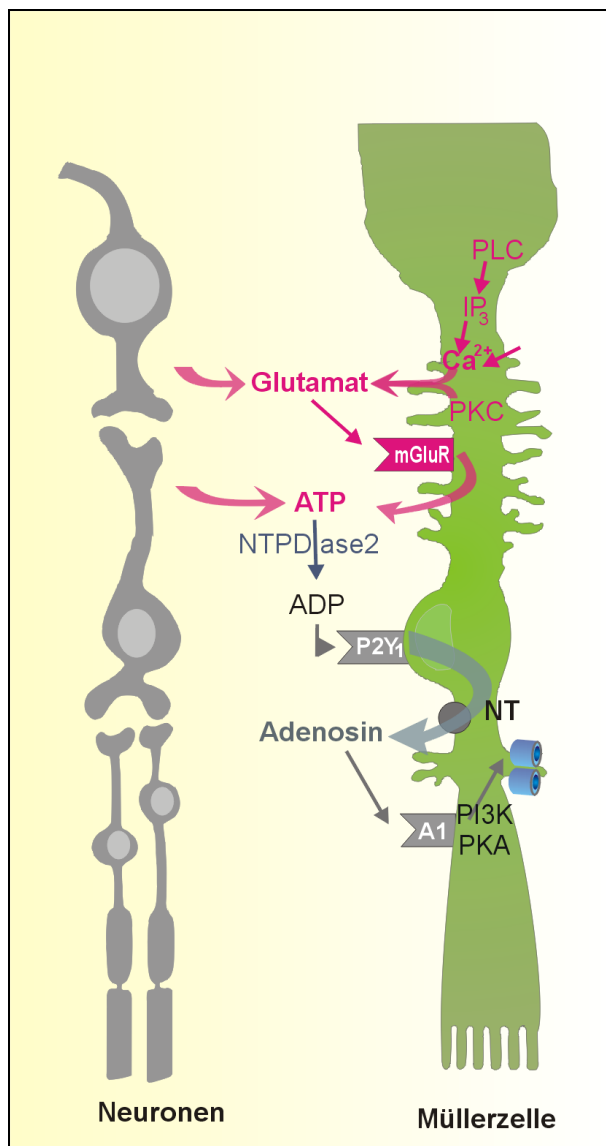


Abbildung 29: Die Glutamat - und ATP-Freisetzung im Rahmen der Schwellungsinhibition.

Das Schema zeigt die durch PhospholipaseC (PLC) und ProteinkinaseC (PKC) ausgelöste gliale und/oder neuronale Glutamatfreisetzung. Diese scheint von intrazellulären Calciumkonzentrationsanstiegen abhängig zu sein, wobei auch (hier nicht gezeigt) eine Öffnung spannungsabhängiger Calciumkanäle durch Aktivierung spannungsabhängiger Natriumkanäle von Bedeutung zu sein scheint. Die Aktivierung der Glutamatrezeptoren wiederum bewirkt eine ATP-Freisetzung, die den Beginn des purinergen Teils der Signalkaskade darstellt.

Des Weiteren wäre es von Interesse, die räumliche Verteilung der verschiedenen Rezeptoren der Kaskade genauer zu untersuchen, um zu verstehen, ob es unterschiedliche Angriffspunkte für die oben aufgeführten Faktoren gibt und diese komplexe Signalgebung eine räumliche Ordnung entlang der dafür scheinbar prädestinierten Müllerzelle hat.

4.4 Die intrinsische Aktivität der Signalkaskade

Wie von Wurm et al. (2009a) bei der Maus nachgewiesen, ist auch bei der Ratte die intrinsische Aktivität des purinergen Teils der unter 4.3 beschriebenen Signalkaskade unter hypotonen Bedingungen ohne Bariumionen für die Volumenregulation von Bedeutung. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass schon unter physiologischen Bedingungen durch osmotischen Stress mechanische Perturbationen ausgelöst werden, die eine Freisetzung von ATP bewirken (Newman and Zahs 1997, 1998). Die folgende Aktivierung von purinergen Rezeptoren mit anschließender Ionenkanalöffnung könnte dann analog zum Bariumpathologiemodell zu einem osmotischen Ausgleich führen. Allerdings sind die Daten nicht ausreichend, um eine abschließende Aussage zu treffen, so dass hierfür weitere Untersuchungen unter Einbeziehung anderer Methoden, z. B. Schwellungsmessungen an isolierten Zellen, nötig sind.

4.5 Die EPO-Applikation bewirkt eine autokrine VEGF-Ausschüttung bei Müllerzellen

Durch die Experimente konnte nicht nur gezeigt werden, dass EPO die bekannte glutamaterge, purinerge Signalkaskade aktiviert, sondern es war darüber hinaus auch eine Involvierung der am VEGF-Signalweg beteiligten Enzyme nachweisbar. Unter Berücksichtigung der unter 3.4.7 vorgestellten Ergebnisse ist es in Anlehnung an die von Wurm et al. (2008) bereits durchgeführten Untersuchungen der VEGF-Wirkung auf die Müllerzellenschwellung vorstellbar, dass folgende intrazelluläre Signalkaskade auch nach EPO- Applikation ausgelöst wird: nach Aktivierung der VEGF-Rezeptorkinase KDR, deren Vorhandensein in Müllerzellen bereits beschrieben wurde (Stitt et al. 1998), ist zu vermuten, dass auch Src-Kinasen an der Vermittlung von intrazellulären Calciumanstiegen über eine PLC-Aktivierung beteiligt sind. Daran könnte sich eine PKC-Aktivierung anschließen. Sowohl PKC als auch PLC könnten einen direkten Einfluss auf eine Glutamatausschüttung von Müllerzellen haben, da ihre Blockade auch an isolierten Zellen die Wirkung von EPO aufhebt (Krügel et al. 2010). Die VEGF-Signaltransduktion über KDR- und Src-Tyrosinkinase-Aktivierung, mit Aktivierung der Phospholipase C, intrazellulären Calciumanstiegen und letztendlicher Aktivierung der PKC ist z. B. für vielfältige Endothelzellreaktionen beschrieben (Zachary 2003) und scheint nicht nur für die Volumenregulation typisch zu sein.

Einerseits ist bekannt, dass Müllerzellen VEGF-Rezeptor 2 (Saint-Geniez et al. 2008) exprimieren. Weiterhin hatte EPO auch an isolierten Müllerzellen eine

schwellungsinhibierende Wirkung (Krügel et al. 2010), was eine Unabhängigkeit der Schwellungsinhibition der Müllerzellen von Neuronen nahe legt und eine autokrine VEGF-Sekretion möglich erscheinen lässt. Im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen mit neutralisierenden Antikörpern gegen VEGF zeigte sich, dass deren Zugabe eine Unterbrechung der durch EPO ausgelösten Schwellungsinhibition, nicht jedoch der durch Glutamat ausgelösten Schwellungsinhibition hervor rief. Es ist außerdem bekannt, dass Müllerzellen VEGF produzieren (Eichler et al. 2000), was die Annahme einer durch EPO initiierten VEGF-Ausschüttung bestärkt. Ob diese Ausschüttung tatsächlich an Müllerzellen geschieht, müsste mit Verfahren nachgewiesen werden, die für die Detektion der Substanzfreisetzung aus isolierten Zellen geeigneter sind. Die Ausschüttung von VEGF im Rahmen der Schwellungsinhibition sollte jedoch, unabhängig vom Ursprung des VEGF, kritisch betrachtet werden: bei pathologischen Geschehen in der Retina führt VEGF durch Erhöhung der Gefäßpermeabilität, Ödeminduktion (Campochiaro, 2004) und Neovaskularisation (Eichler et al. 2004) zur Entstehung von sekundären Schäden. Auch die durch VEGF ausgelöste Glutamatausschüttung könnte im Sinne einer Exzitotoxizität an der Schwellung von retinalen Neuronen beteiligt sein (Wurm et al. 2008). Allerdings konnte ebenso gezeigt werden, dass von Gliazellen stammendes Glutamat die Aktivität von retinalen Neuronen über Stimulation von inhibitorischen Interneuronen mindert (Newman and Zahs, 1998). Darüberhinaus sind für VEGF auch neuroprotektive Funktionen (Yashura et al. 2004) wie Vasodilatation, Förderung des Endothel -und Gliazellüberlebens (Storkebaum et al. 2004, Saint-Geniez et al. 2008) beschrieben. Es konnte an der gesunden Retina gezeigt werden, dass es nach Neutralisierung des natürlich im Gewebe vorkommenden VEGF zu einer erhöhten Apoptoserate in der inneren und äußeren Körnerzellschicht kommt (Saint-Geniez et al. 2008), was auch auf eine physiologische Bedeutung dieses Cytokins hinweist.

Die Stimulation der VEGF-Sekretion durch EPO wurde schon an glomerulären Endothelzellen (Nitta et al. 1999) und Zellkulturen von neuralen Vorläuferzellen beobachtet. Bei diesen verlief der Signalweg mit Beteiligung von MAP-Kinasen (Wang et al. 2008). Durch die im Rahmen der Arbeit durchgeführten Experimente mit PD 98059, einem MAP-Kinaseinhibitor, zeigte sich, dass die VEGF- Ausschüttung durch EPO über eine MAP-Kinaseaktivierung abläuft. Dieser MAP-Kinasenaktivierung vorgeschaltet müsste die Phosphorylierung der Jak-2 stattfinden, was in den Experimenten durch Verhinderung des EPO-Effekts mit AG490 gezeigt wurde (Abb.

30). Die Ausschüttung von VEGF im Rahmen der Schwellungsinhibition durch EPO scheint also über Aktivierung der Jak-2, die typischerweise an das EPO-Rezeptorhomodimer bindet, mit daran anschließender MAP-Kinasenaktivierung zu erfolgen. Die Aktivierung von MAP-Kinasen ist mit einer Vielzahl zellulärer Reaktionen wie Proliferation, Differenzierung, Entwicklung, Überleben, Apoptose und axonalem Wachstum verbunden (Akiyama et al. 2002).

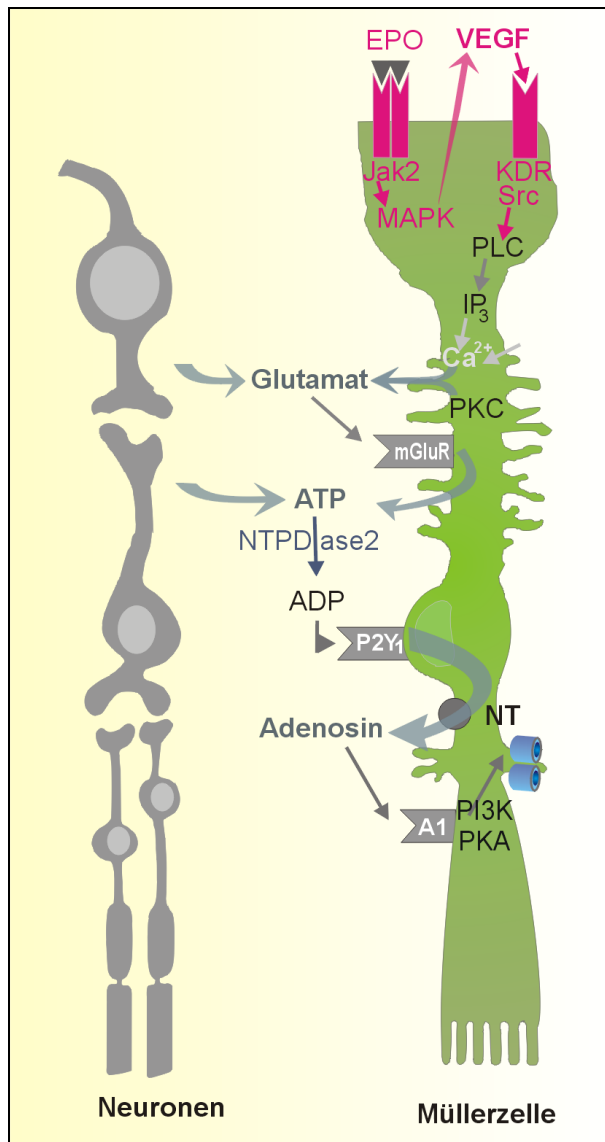


Abbildung 30: Die durch EPO ausgelöste VEGF-Ausschüttung und die dabei angestoßene intrazelluläre Signalkaskade.

Die Bindung von EPO führt zur Dimerisierung des EPO-Rezeptors mit folgender Januskinasen2-Aktivierung (Jak2). Im Folgenden kommt es zur MAP-Kinase-Aktivierung, der die VEGF-Ausschüttung nachgeschaltet ist. Die VEGF-Rezeptoraktivierung bewirkt eine KDR-Phosphorylierung, mit anschließender Src-Aktivierung. Das Ergebnis dieses Weges ist der Anstoß zur Glutamatfreisetzung.

Weiterhin scheint die Aktivierung von MAP-Kinasen, die in der Retina unter anderem von Müllerzellen exprimiert werden, bei retinaler Ischämie-Reperfusion auf die Ganglienzellen durch Glia-Neuron-Interaktionen neuroprotektiv zu wirken (Akiyama et al. 2002). Dies zeigt die neuroprotektiven Fähigkeiten von EPO über die vorteilhaften Effekte der Schwellungsinhibition hinaus.

Auf Grund der widersprüchlichen Daten bezüglich neuroprotektiver einerseits und neurodestruktiver Potentiale andererseits wäre es interessant, die Mechanismen der VEGF-Sekretion durch EPO in Zukunft näher zu ergründen. Gerade bei Retinopathien, die mit Ischämie einhergehen, scheint dies bedeutungsvoll, da die Transkription beider Zytokine durch den hypoxieinduzierbaren Faktor 1 induziert wird, der bei Hypoxie hochreguliert wird (Lacombe, Mayeux 1998). Der schwellungsinhibierende Effekt der EPO-induzierten VEGF-Freisetzung an diabetischen Netzhäuten (Krügel et al. 2010) kann als neuroprotektiver Aspekt gewertet werden.

4.6 Veränderung der Expression von EPO-Rezeptoren in der diabetischen Retina

Sowohl in der gesunden, als auch in der diabetischen Retina fand sich eine deutliche EPO-Rezeptorfärbung, vor allem in den inneren Retinaschichten. Deutlich waren dabei vor allem die Ganglienzellen gefärbt. Eine Färbung von EPO-Rezeptoren auf Ganglienzellen konnte von Shah et al. (2009) auch am gesunden humanen Netzhautgewebe nachgewiesen werden. Die von ihnen beobachtete Zunahme der EPO-Rezeptorexpression an der humanen diabetischen Netzhaut ließ sich an der Netzhautfärbung der diabetischen Ratte nicht bestätigen.

In den Schnitten der diabetischen Tiere stellt sich eine Doppelmarkierung für Glutaminsynthetase und EPO-Rezeptor vermutlich entlang von Blutgefäßen dar, was bei den unbehandelten Netzhäuten nicht auftritt. Eine Erklärung für diese mögliche Kolo-kalisation wäre die Hypoxie, die durch endothelschädigende glykosylierte Proteine typischerweise bei Diabetes auftritt (Bringmann, Reichenbach 2010). In Endothelzellkulturen ist eine vermehrte Expression des EPO-Rezeptors unter hypoxischen Bedingungen beschrieben (Beleslin-Cokic et al. 2004). Im gesunden Hirngewebe fanden Brines et al. (2000) eine Lokalisation von EPO-Rezeptoren auf Astrozytenfortsätzen um Blutgefäße und Endothelzellen. Es wäre deshalb weiterführend sinnvoll, die exakte Rezeptorverteilung auch für die Retina elektronenmikroskopisch zu

bestimmen. Warum die Expression des EPO-Rezeptors um Blutgefäße in der Retina im Gegensatz zum Hirn erst unter pathologischen Bedingungen auftritt, ist ungeklärt.

Insgesamt scheint die EPO-Rezeptorfärbung auf den meisten Müllerzellen diabetischer Tiere im Vergleich mit Müllerzellen gesunder Tiere reduziert. Es muss in Betracht gezogen werden, dass es bei übermäßiger Stimulation zur Internalisierung des Rezeptors kommen kann. Brines und Cerami (2005) stellten die Hypothese auf, dass proinflammatorische Zytokine zu einer Hochregulation des EPO-Rezeptors auf der einen Seite, aber zu einer Herunterregulation der lokalen EPO-Produktion auf der anderen Seite führen und die EPO-Substitution deshalb in pathologischen Zuständen wie Ischämie-Reperfusion oder diabetischer Retinopathie sinnvoll erscheinen würde. Diese Hypothese steht im Widerspruch zu dem hier gezeigten Befund, dass der EPO-Rezeptor eher herunterreguliert wird. Dennoch konnte die EPO-Gabe das Schwellen der Müllerzellen in diabetischen Netzhäuten verhindern (Krügel et al. 2010), was die EPO-Gabe unter Ödemaspekten trotzdem sinnvoll erscheinen lässt. Eine weitere Untersuchung der einzelnen Gruppen durch genauere Methoden, wie die Elektronenmikroskopie, wäre wünschenswert. Dies betrifft unter anderem die Darstellung von EPO-Rezeptoren entlang der Gefäßwände. Auch die Minderexpression der EPO-Rezeptoren im Krankheitsverlauf der diabetischen Retinopathie wäre ein weiterer interessanter Untersuchungspunkt.

Es scheint, als werde die Glutaminsynthetase in der diabetischen Netzhaut vermindert exprimiert. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Glutaminsynthetase ein substratreguliertes Enzym ist. So konnten Germer et al. (1997) zeigen, dass eine Erhöhung der Glutamatkonzentration im Medium eine Steigerung des Glutaminsynthetasegehalts der Müllerzellen bewirkte. Die Abnahme der Netzhautdicke, vor allem in der ONL, scheint durch einen Verlust an Photorezeptorzellen bedingt. Da Photorezeptoren glutamaterg sind, müsste sich hier die extrazelluläre Glutamatkonzentration verringern. Dies könnte die niedrigere Glutaminsynthetasedarstellung erklären. Eine Abnahme der Glutaminsynthetaseexpression konnte ebenfalls bei Lichtschädigung der Netzhaut beobachtet werden, die mit Photorezeptordegeneration und somit verminderten Substratangebot einhergeht (Grosche et al. 1995). Weiterhin beschrieben Shen und Xu (2009), dass es in Müllerzell-Zellkulturen bei erhöhter Glukosekonzentration und IL1-beta Zugabe, zu einer verminderten Glutaminsynthetaseexpression kommt. Da die erhöhte extrazelluläre Glukosekonzentration und erhöhte Konzentrationen von

Entzündungsmediatoren diabetischen Verhältnissen entsprechen, stützt diese Arbeit die oben beschriebene Beobachtung. Bei den hier untersuchten diabetischen Tieren wäre ein Zusammenspiel aus mangelndem Substratangebot und diabetischer Stoffwechsellaage als Erklärung für das verminderte Glutaminsynthesesignal möglich.

4.7 Die Bedeutung der Schwellungsinhibition durch EPO bei Entzündungsgeschehen

Durch die Experimente wurde gezeigt, dass Arachidonsäure (AA), Prostaglandin E₂ (PGE₂) und H₂O₂ ohne vorherige Inkubation mit Bariumionen eine osmotische Schwellung an Müllerzellen auslösen konnten. Auch bei Astrozyten konnte durch Arachidonsäure eine Schwellung verursacht werden (Staub et al. 1994a). Arachidonsäure (Chan et al. 1983a) und Prostaglandin E₂ (Asano et al. 1987) gelten auch als Hauptverursacher von vaskulärem und zellulärem Hirnödem, was vermuten lässt, dass grundlegende Vorgänge der Ödementstehung in Hirn und Retina analog ablaufen. Für die Retina sind AA und PGE₂ als Hauptmediatoren des zystoiden Makulaödems beschrieben (Guex-Crosier 1999; Miyake, Ibaraki 2002). Arachidonsäure kann die Bildung freier Sauerstoffradikale induzieren (Chan et al. 1988). Außerdem stellt Arachidonsäure ein Substrat für Cyclooxygenasen und Lipoxygenasen dar, durch deren Aktivität Prostaglandine bzw. Leukotriene entstehen, biologisch hochaktive Verbindungen, die unter anderem am Entzündungsgeschehen beteiligt sind. Pathogenetisch scheint für die Auslösung der Zellschwellung eine Erhöhung der intrazellulären Natriumionenkonzentration verantwortlich zu sein, die dann aus osmotischen Gründen zu einem nachfolgenden Wassereinstrom führt (Chan et al. 1989, Winkler et al. 2000). Diese Erhöhung der Natriumionenkonzentration könnte einerseits durch eine reduzierte Aktivität der Na⁺/K⁺-ATPase (Chan et al. 1983b, Lees 1991, Owada et al. 1999) verursacht werden. Andererseits könnte AA die Lipidperoxidation forcieren, was möglicherweise zu einer Funktionsstörung von Ionenkanälen und einer erhöhten Na⁺-Permeabilität führt (Staub et al. 1994a, Winkler et al. 2000).

Die Müllerzellschwellung nach Arachidonsäure- und Prostaglandinzugabe wird durch EPO verhindert, wofür die Aktivierung der purinerger Signalkaskade mit schließlicher Öffnung von K⁺- und Cl⁻-Kanälen verantwortlich sein dürfte. Auch Uckermann et al. (2005) wiesen an Müllerzellen eine durch AA induzierte Schwellung in hypotoner Lösung nach, welche durch Aktivierung von in die Signalkaskade involvierten Adenosinrezeptoren inhibiert werden konnte. Für VEGF wurde von Wurm et al. (2008)

eine Wirksamkeit gegen die durch H_2O_2 induzierte Gliazellschwellung nachgewiesen. Das Unvermögen mit EPO- Zugabe die durch H_2O_2 verursachte Schwellung wieder aufzuheben, könnte an einer Denaturierung des EPOs durch H_2O_2 liegen, womit seine biologische Wirksamkeit verloren ginge.

Lokale Entzündungsreaktion und oxidativer Stress gelten als pathogene Faktoren bei ödemassoziierten Erkrankungen der Retina, beispielsweise der diabetischen Retinopathie (Joussen et al. 2001, van Dam 2002, Joussen et al. 2004, Leal et al. 2005). In diesem Sinne könnte die beobachtete Hemmung der Müllerzellschwellung bei diabetischen Ratten durch EPO und die Verhinderung der Entstehung von Entzündungsmediatoren klinisch-therapeutisch für die Behandlung ödemassoziiierter retinaler, eventuell sogar cerebraler Erkrankungen von Bedeutung sein.

4.8 Die potentielle Bedeutung von EPO für die Behandlung von Netzhaut- und Hirnödemen

In den vorhergehenden Kapiteln konnte gezeigt werden, dass EPO ein potentes Pharmakon zur Auflösung des zytotoxischen Ödems in Gliazellen ist. Daraus ergibt sich ein neuer Mechanismus für die protektive Wirkung dieser Substanz. Die Inhibition der Müllerzellschwellung könnte bei diabetischer Retinopathie von Bedeutung sein und eine bereits von Zhu et al. (2008) vorgeschlagene frühe Behandlung mit EPO sinnvoll erscheinen lassen. Bei diabetischer Retinopathie sind schon vor dem Auftreten der Schädigungen an retinalen Gefäßen Gliazellen und Neuronen von Veränderungen betroffen (Barber 2003, Gardner et al. 2002, Lieth et al. 2000). Eine funktionelle Störung der Müllerzellen konnte mit elektroretinographischen Untersuchungen an diabetischen Ratten zu frühen Zeitpunkten im Krankheitsverlauf nachgewiesen werden. Dabei waren zu dieser Zeit keine morphologischen Veränderungen der Retina feststellbar (Zhu et al. 2008). Erste Befunde an kleineren Patientengruppen ergaben bereits Hinweise auf eine Verbesserung des Sehvermögens bei EPO-Behandlung eines diabetischen Patienten mit Makulaödem. In Zukunft müsste dies in größeren klinischen Studien bestätigt werden. So konnten Friedmann et al. (2003) in einer retrospektiven Studie zeigen, dass sich bei 3 Patienten mit diabetischem Makulaödem und diabetischem Nierenversagen, weshalb eine EPO-Behandlung indiziert war, ein Verlust des Gesichtssinns aufhalten ließ und eine Ödemauflösung stattfand. In einer weiteren Patientengruppe mit diabetischem Nierenversagen in Endstadium kam es unter EPO-Behandlung sogar zu einer

Verbesserung des Gesichtssinnes und einer Auflösung von harten Exsudaten (Berman, Friedman 1994).

Neben der speziellen ödemauflösenden Wirkung ist bereits bekannt, dass EPO gewebsschutzend in präklinischen Pathologiemodellen der ischämischen, traumatischen, toxischen, und entzündlichen Art ist (Brines et al. 2004). In autokriner und parakriner Weise limitiert EPO die Aktivität proinflammatorischer Zytokine in Hirn, Herz, Niere und anderen Geweben und fördert die Heilung nach Verletzungen (Brines, Cerami 2006), wobei Entzündungshemmung und Reduktion lokaler Ödeme als Wirkmechanismen genannt werden (Brines et al. 2008). Als wichtige Voraussetzung seiner neuroprotektiven Wirkung kann EPO sowohl die Blut-Hirn-Schranke (Brines et al. 2000) als auch die Blut-Retina-Schranke (Grimm et al. 2002) überwinden. In einer klinischen Studie mit Schlaganfallpatienten konnte durch eine hochdosierte intravenöse EPO-Gabe der Infarktschaden reduziert werden und ein verbessertes klinisches Endergebnis nach einem Monat erzielt werden. Dabei wurde die EPO-Gabe an sich gut toleriert und rief keine akuten Nebenwirkungen hervor (Ehrenreich et al. 2002).

Die hier gezeigten Ergebnisse sind ein weiterer Schritt zum Verständnis der neuroprotektiven EPO-Wirkung und bieten eine vielversprechende und spezifische Therapieoption für das Netzhautödem. Im weiteren Sinne sind sie auch interessant für Hirnverletzungen, die mit Ödembildung einhergehen, wie zum Beispiel Schlaganfälle und Schädel-Hirn-Traumen, vor allem, da derzeit für Hirnödeme, speziell der zytotoxischen, keine befriedigende Therapieoption besteht.

5 Zusammenfassung der Arbeit

Im Rahmen von Krankheitsbildern des zentralen Nervensystems (ZNS), die mit einer Flüssigkeitsansammlung (Ödem) im Gewebe einhergehen, kann es zu einer interstitiellen Ansammlung von Flüssigkeit durch einen Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke (vasogenes Ödem) und zu einer intrazellulären Flüssigkeitsakkumulation (zytotoxisches Ödem) kommen. Das zytotoxische Ödem des Nervengewebes ist durch eine Anreicherung von Flüssigkeit in glialen Zellen gekennzeichnet, in der Retina sind dies vor allem die Müllerschen Gliazellen. Müllerzellen gelten mittlerweile als Modell für die Makrogliazellen des ZNS. Eine ihrer wichtigsten Aufgaben stellt die Erhaltung der Wasser- und Ionenhomöostase im retinalen Gewebe dar. Wenn diese Müllerzellfunktion z. B. durch Erkrankungen wie Ischämie, Diabetes oder Entzündung gestört ist, kann es zur Flüssigkeitsakkumulation bzw. Ödembildung im retinalen Gewebe kommen.

Zur Erforschung der Mechanismen, die zu einer intrazellulären Flüssigkeitsansammlung in Müllerzellen führen, wurde von Pannicke et al. (2004) folgendes Tiermodell entwickelt, das auch in dieser Arbeit Anwendung fand:

In postischämischen Netzhäuten der Ratte reagieren Müllerzellen unter hypotonen Bedingungen mit einer Zellschwellung. Diese Müllerzellschwellung in hypotonem Milieu kann auch beobachtet werden, wenn in Kontrollnetzhäuten die K^+ -Kanäle der Müllerzellen mit Ba^{2+} blockiert werden.

Im Hinblick auf die Erforschung der Mechanismen, die zu einem intrazellulären Ödem führen, wurde auch in der vorliegenden Arbeit das Schwellungsverhalten von Müllerzellen der Ratte in hypotoner Lösung untersucht. Dazu wurden die Netzhäute der Ratte entnommen und die Müllerzellen in Netzhautschnitten selektiv mit einem Fluoreszenzfarbstoff angefärbt. Es erfolgte eine 10minütige Inkubation mit Ba^{2+} und die Untersuchung der Soma-Querschnittsflächen der Müllerzellen im Laser-Scanning-Mikroskop. Die Netzhaut wurde dabei ständig mit einer extrazellulären Lösung perfundiert, wodurch die Zellen vital untersucht werden konnten. Außerdem erfolgte über die Perfusion die Zugabe von Testsubstanzen. Durch wiederholte Ausmessung der Somaflächen von Müllerzellen mittels einer speziellen Software des Laser-Scanning-Mikroskops über einen Zeitraum von 4 min konnten Veränderungen der

Querschnittsfläche dokumentiert und damit Rückschlüsse auf Volumenänderung gezogen werden.

Das Ziel dieser Arbeit war es, den Effekt von Erythropoietin (EPO) auf die Müllerzellschwellung und den zugrunde liegenden Signalweg genauer zu untersuchen. Die Zugabe von EPO (1 nM) konnte die Müllerzellschwellung in hypotoner Bariumlösung verhindern. Der EC_{50} -Wert der Schwellungsinhibition an Müllerzellen durch EPO lag bei ca. 7 pM. Auch die durch Arachidonsäure und Prostaglandin E₂ hervorgerufene Schwellung konnte durch EPO aufgehoben werden. Eine schwellungsinhibierende Wirkung konnte auch für den Vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) und für Glutamat nachgewiesen werden.

Der EC_{50} -Wert der Schwellungsinhibition an Müllerzellen durch EPO lag bei ca. 7 pM. Im Folgenden wurde der durch EPO ausgelöste Signalweg zur Schwellungshemmung untersucht. Durch Zugabe verschiedener Testsubstanzen zur hypotonen Ba^{2+} -Lösung mit EPO-Zusatz konnte der Einfluss der Substanz auf den schwellungsinhibierenden EPO-Effekt untersucht werden.

Folgende Substanzen konnten den schwellungshemmenden EPO-Effekt aufheben:

- die Kaliumkanalblocker Clofilium und Chinin und die Chloridkanalblocker Flufenamic Acid und NPPB
- der A_1 -Rezeptorblocker DPCPX
- der PKA- Antagonist H-89 und der PI3-Kinase-Inhibitor LY29-4002
- der Nukleosidtransporterinhibitor NBTI
- der $P2Y_1$ -Antagonist MRS2179
- der NTPDase-Inhibitor ARL67156
- der $mGluR_1$ -Antagonist CPCCOEt, der Glutamatrezeptorantagonist der Gruppe II EGLU und der $mGluR_3$ - Antagonist LY-341495
- der Inhibitor der vesikulären H^+ -ATPase Bafilomycin A1
- der PKC-Blocker Gö 6976
- der Calciumchelator BAPTA/AM
- der Inhibitor der Phospholipase C U73122
- die Blocker von spannungsabhängigen Na^+ bzw. Ca^{2+} -Kanälen, Tetrodotoxin und Cadmium
- der selektive Inhibitor der VEGF-Rezeptor-Tyrosinkinase KDR SU1498
- die selektiven Src-Kinaseinhibitoren PP-1 und SU 6656

Folgende Testsubstanzen konnten die schwellungshemmende Wirkung von EPO, nicht jedoch von VEGF und Glutamat aufheben:

- löslicher EPO-Rezeptor
- Januskinase-2-Inhibitor AG 490
- MAP-Kinase-Inhibitor PD98059

Neutralisierende anti-VEGF Antikörper konnten den schwellungsinhibierenden Effekt von EPO und VEGF, aber nicht von Glutamat hemmen.

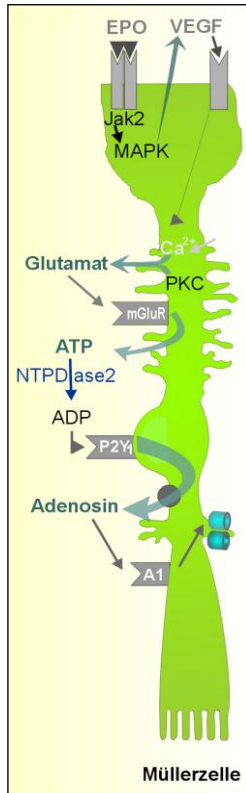
Dabei zeigte sich jeweils, dass die EPO-Wirkung, nicht jedoch die VEGF- und Glutamatwirkung aufgehoben wurde.

Keinen Einfluss auf den schwellungshemmenden EPO-Effekt hatten:

- der EGF-Rezeptorkinase- Inhibitor AG 1478
- der Ekto-5'- Nukleotidaseinhibitor AOPCP

Auf Grund dieser Messergebnisse und der von Wurm et al. (2008) beschriebenen Signalwege für VEGF ist es wahrscheinlich, dass die Schwellungsinhibition durch EPO über folgenden Signalweg vermittelt wird:

Nach der Dimerisierung des EPO-Rezeptors kommt es zur Autophosphorylierung der Januskinase-2 mit anschließender MAP-Kinase-Aktivierung. Dadurch scheint es zur Ausschüttung von VEGF zu kommen. Dieser bindet an die Rezeptor-Tyrosinkinase KDR und setzt nachfolgend eine Signalkaskade in Gang, die die Aktivierung von Src-Kinasen, PLC und PKC beinhaltet. Im weiteren Verlauf scheint ein intrazellulärer Calciumanstieg und die Aktivierung von spannungsabhängigen Calcium- und Natriumkanälen von Bedeutung zu sein. Diese Vorgänge scheinen eine Glutamatausschüttung zu bewirken, durch die es zur Aktivierung verschiedener Subtypen der Glutamatrezeptorgruppen I und II kommt. In der Folge wird von Müllerzellen ATP freigesetzt, welches extrazellulär durch die NTPDase 2 zu ADP abgebaut wird. Das entstandene ADP aktiviert P2Y₁-Rezeptoren, was wiederum eine Ausschüttung von Adenosin über Nukleosidtransporter auslöst. Letztendlich bindet Adenosin an A₁-Rezeptoren. Dies bewirkt eine PI3-Kinase- und PKA-Aktivierung, wodurch es zur Öffnung von Barium- und Arachidonsäure-insensitiven Kalium- und Chloridkanälen kommt.



Weiterhin konnte gezeigt werden, dass EPO auch an isolierten Müllerzellen wirkt (Krügel et al. 2010), so dass von einer autokrinen Sekretion von VEGF, Glutamat, ATP und Adenosin aus den Zellen ausgegangen werden kann. Diese physiologischen Daten konnten durch den immuncytochemischen Nachweis von EPO-Rezeptoren auf isolierten Müllerzellen bestätigt werden.

Weitere Untersuchungen ergaben, dass es in hypotoner Lösung ohne Ba^{2+} -Zugabe durch Blockade von $P2Y_1$ -Rezeptoren mit MRS 2179 und von A_1 -Rezeptoren mit DPCPX zu einer Müllerzellschwellung kam. Das lässt vermuten, dass für die Volumenregulation der Müllerzellen eine intrinsische Aktivität des purinergen Teils der Signalkaskade bedeutsam ist.

Abbildung 31: Schematische Darstellung der wichtigsten Schritte der schwellungsinhibierenden Signalkaskade. Nähere Erklärung im Text

In der vorliegenden Arbeit konnte ein schwellungsinhibierender Effekt des EPO gezeigt, der zugrunde liegende Signalweg in großen Teilen nachvollzogen und der EPO-Rezeptor auf Müllerzellen dargestellt werden. Im Hinblick auf die Therapie von Ödemen des ZNS könnten sich durch weitere Forschungen und Untersuchungen zum EPO neue Möglichkeiten ergeben.

In der Netzhaut sind Ödeme nicht selten. So kann es beispielsweise im Rahmen verschiedener Erkrankungen, wie der diabetischen Retinopathie, Traumata, Tumoren, Entzündungen oder vaskulären Erkrankungen zu einem Makulaödem kommen, das mit einer schlechten Prognose einhergeht.

Pathologische Flüssigkeitsansammlungen im Hirngewebe führen rasch zu einer Steigerung des intrazerebralen Druckes, der aufgrund der geringen Ausdehnungsmöglichkeiten des Gewebes innerhalb des knöchernen Schädels zu einer irreversiblen Schädigung des Hirngewebes führen kann.

Bisher werden die Ödeme des ZNS mit Glukokortikoiden zur Entzündungshemmung und entwässernden Diuretika und Mannitol behandelt. Letztere wirken dabei aber lediglich symptomatisch, wenn das Ödem bereits vorhanden ist.

Mit dem Einsatz von EPO in der Therapie des intrazellulären Ödems könnte in Zukunft bereits spezifisch der Ödementstehung entgegengewirkt werden.

6 Literaturverzeichnis

Abbracchio, M.P., Burnstock, G., Boeynaems, J.M., Barnard, E.A., Boyer, J., Kennedy, C., Knight, G.E., Fumagalli, M., Gachet, C., Jacobson, K.A., Weisman, G.A. (2006): International Union of Pharmacology LVIII: Update on the P2Y G Protein-Coupled Nucleotide Receptors: From Molecular Mechanisms and Pathophysiology to Therapy. *Pharmacol Rev.* 58, 281-341.

Aiello, L.P. (2005): Angiogenic pathways in diabetic retinopathy. *N Engl J Med.* 353, 839-841.

Akiyama, H., Nakazawa, T., Shimura, M., Tomita, H., Tamai, M. (2002): Presence of mitogen-activated protein kinase in retinal Müller cells and its neuroprotective effect ischemia-reperfusion injury. *Neuroreport* 13, 2103-2107.

Asano, T., Shigeno, T., Johshita, H., Usui, M., Hanamura, T. (1987): A novel concept on the pathogenetic mechanism underlying ischaemic brain oedema: relevance of free radicals and eicosanoids. *Acta Neurochir Suppl. (Wien).* 41, 85-96.

Barber, A. J. (2003): A new view of diabetic retinopathy: a neurodegenerative disease of the eye. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 27, 283– 290.

Berman, D.H., Friedman, E.A. (1994): Partial absorption of hard exsudates in patients with diabetic end-stage renal disease and severe anaemia after treatment with erythropoietin. *Retina* 14, 1-5.

Bernaudin, M., Bellail, A., Marti, H.H., Yvon, A., Vivien, D. Duchatelle, I., Mackenzie, E.T., Petit, E. (2000): Neurons and astrocytes express EPO mRNA: oxygen-sensing mechanisms that involve the redox-state of the brain. *Glia* 30, 271-278.

Beleslin-Cokic, B.B., Cokic, V.P., Yu, X., Weksler, B.B., Schechter, A.N., Noguchi, C.T. (2004): Erythropoietin and hypoxia stimulate erythropoietin receptor and nitric oxide production by endothelial cells. *Blood* 104, 2037-2080.

Brines, M.L., Ghezzi, P., Keenan, S., Agnello, D., de Lanerolle, N.C., Cerami, C., Itri, L.M., Cerami, A. (2000): Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97, 10526-10531.

Brines, M., Grasso, G., Fiordaliso, F., Sfacteria, A., Ghezzi, P., Fratelli, M., Latini, R., Xie, Q.W., Smart, J., Su-Rick, C.J., Pobre, E., Diaz, D., Gomez, D., Hand, C., Coleman, T., Cerami, A. (2004): Erythropoietin mediates tissue protection through an erythropoietin and beta-subunit heteroreceptor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 101, 14907-14912.

Brines, M., Cerami, A. (2005): Emerging biological roles for erythropoietin in the nervous system. *Nat Rev Neurosci.* 6, 484-494.

Brines, M., Cerami, A. (2006): Discovering erythropoietin's extra-hematopoietic functions: biology and clinical promise. *Kidney Int.* 70, 246-250.

Brines, M., Patel, N.S.A., Villa, P., Brines, C., Mennini, T., De Paola, M., Erbayraktar, Z., Erbayraktar S., Sepodes, B., Thiernemann, C., Ghezzi, P., Yamin, M., Hand, C.C., Xie, Q., Coleman, T., Cerami, A. (2008): Nonerythropoietic, tissue-protective peptides derived from the tertiary structure of erythropoietin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 105, 10925-10930.

Bringmann, A., Biedermann, B., Faude, F., Enzmann, V., Reichenbach, A. (2000a): Na⁺ currents through Ca²⁺ channels in human retinal glial (Müller) cells. *Curr Eye Res.* 20, 420-429.

- Bringmann, A., Biedermann, B., Schnurbusch, U., Enzmann, V., Faude, F., Reichenbach, A. (2000b): Age- and disease-related changes of calcium channel-mediated currents in human Müller glial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 41, 2791-2796.
- Bringmann, A., Reichenbach, A., Wiedemann, P. (2004): Pathomechanism of cystoid macular edema. *Ophthalmic Res.* 36, 241-249.
- Bringmann, A., Pannicke, T., Grosche, J., Francke, M., Wiedemann, P., Skatchkov, S.N., Osborne, N.N., Reichenbach, A. (2006): Müller cells in the healthy and diseased retina. *Prog Retin Eye Res.* 25, 397–424.
- Bringmann, A., Reichenbach, A. (2010): Neuroglia in the Diabetic Retina. In: Hammes, H.-P., Porta, M.: *Experimental Approaches to Diabetic Retinopathy.* Front Diabetes Bd. 20, Basel, Karger, 79-97.
- Burnstock, G. (2006): Purinergic signalling. *Br J Pharmacol.* 147, 172-181.
- Campochiaro, P.A. (2004): Ocular neovascularisation and excessive vascular permeability. *Expert Opin Biol Ther.* 4, 1395-1402.
- Chan, P.H., Fishman, R.A., Caronna, J., Schmidley, J.W., Prioleau, G., Lee, J. (1983a): Induction of brain edema following intracerebral injection of arachidonic acid. *Ann Neurol.* 13, 625-632.
- Chan, P.H., Kerlan, R., Fishman, R.A. (1983b): Reductions of gamma-aminobutyric acid and glutamate uptake and (Na⁺/ K⁺)-ATPase activity in brain slices and synaptosomes by arachidonic acid. *J Neurochem.* 40, 309-316.
- Chan, P.H., Chen, S.F., Yu, A.C. (1988): Induction of intracellular superoxide radical formation by arachidonic acid and by polyunsaturated fatty acids in primary astrocytic cultures. *J Neurochem.* 50, 1185-1193.
- Chan, P.H., Longar, S.U., Chen, S., Yu, A.C.H., Hillered, L., Chu, L., Imaizumi, S., Pereira, B., Moore, K., Woolworth, V., Fishman, R.A. (1989): The role of arachidonic acid and oxygen radical metabolites in the pathogenesis of vasogenic brain edema and astrocytic swelling. *Ann N Y Acad Sci.* 559, 237- 247.
- Crépel, V., Panenka, W., Kelly, M.E.M., MacVicar, B.A. (1998): Mitogen-activated protein and tyrosine kinases in the activation of astrocyte volume-activated chloride current. *J Neurosci.* 18, 1196–1206.
- Dmitriev, A.V., Govardovskii, V.I., Schwahn, H.N., Steinberg, R.H. (1999): Light-induced changes of extracellular ions and volume in the isolated chick retina-pigment epithelium preparation. *Vis Neurosci.* 16, 1157-1167.
- Du, Y., Sarthy, V.P., Kern, T.S. (2004): Interaction between NO and COX pathways in retinal cells exposed to elevated glucose and retina of diabetic rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 287, 735-741.
- Ehrenreich, H., Hasselblatt, M., Dembowski, C., Cepek, L., Lewczuk, P., Stiefel, M., Rustenbeck, H.H., Breiter, N., Jacob, S., Knerlich, F., Bohn, M., Poser, W., Rüther, E., Kochen, M., Gefeller, O., Gleiter, C., Wessel, T.C., De Ryck, M., Itri, L., Prange, H., Cerami, A., Brines, M., Sirén, A.L. (2002): Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial. *Mol Med.* 8, 495–505.
- Eichler, W., Kuhrt, H., Hoffmann, S., Wiedemann, P., Reichenbach, A. (2000): VEGF release by retinal glia depends on both oxygen and glucose supply. *Neuroreport* 11, 3533–3537.
- Eichler, W., Yafai, Y., Wiedemann, P., Reichenbach, A. (2004): Angiogenesis-related factors derived from retinal glial (Müller) cells in hypoxia. *Neuroreport* 15, 1633-1637.

- Ernest, N.J., Weaver, A.K., Van Duyn, L.B., Sontheimer, H.W. (2005): Relative contribution of chloride channels and transporters to regulatory volume decrease in human glioma cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 288, 1451-1460.
- Felmy, F., Pannicke, T., Richt, J.A., Reichenbach, A., Guenther, E. (2001): Electrophysiological properties of rat retinal Müller (glia) cells in postnatal developing and in pathologically altered retinae. *Glia* 34, 190-199.
- Friedman, E.A., L'Esperance, F.A., Brown, C.D., Berman, D.H. (2003): Treating azotemia-induced anemia with erythropoietin improves diabetic eye disease. *Kidney Int Suppl.* 87, 57-63.
- Fu, Q.L., Wu, W., Wang, H., Li, X., Lee, V.W., So, K.F. (2008): Up-regulated endogenous erythropoietin/erythropoietin receptor system and exogenous erythropoietin rescue retinal ganglion cells after chronic ocular hypertension. *Cell Mol Neurobiol.* 28, 317-329.
- Garcí-Arumí, J., Fonollosa, A., Macià, C., Hernandez, C., Martinez-Castillo, V., Boixadera, A., Zapata, M.A., Simó, R. (2008): Vitreous levels of erythropoietin in patients with macular oedema secondary to retinal vein occlusion: a comparative study with diabetic macular oedema. *Eye (Lond.)* 23, 1066-1071.
- García-Ramírez, M., Hernández, C., Simó, R. (2008): Expression of erythropoietin and its receptor in the human retina: a comparative study of diabetic and nondiabetic subjects. *Diabetes Care* 31, 1189-1194.
- Gardner, T.W., Antonetti, D.A., Barber, A.J., LaNoue, K.F., Levison, S.W. (2002): Diabetic retinopathy: more than meets the eye. *Surv Ophthalmol.* 47, 253-262.
- Genc, S., Koroglu, T.F., Genc, K. (2003): Erythropoietin and the nervous system. *Brain Res.* 1000, 19-31.
- Germer, A., Jahnke, C., Mack, A., Enzmann, V., Reichenbach, A. (1997): Modification of glutamine synthetase expression by mammalian Müller (glia) cells in retinal organ cultures. *Neuroreport* 8, 3067-3072.
- Ghiardi, G.J., Gidday, J.M., Roth, S. (1999): The purine nucleoside adenosine in retinal ischemia-reperfusion injury. *Vision Res.* 39, 2519-2535.
- Grimm, C., Wenzel, A., Groszer, M., Mayser, H., Seeliger, M., Samardzija, M., Bauer, C., Gassmann, M., Remé, C.E. (2002): HIF-1-induced erythropoietin in the hypoxic retina protects against light-induced retinal degeneration. *Nat Med.* 8, 718-724.
- Grosche, J., Härtig, W., Reichenbach, A. (1995): Expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP), glutamine synthetase (GS), and Bcl-2 protooncogene protein by Müller (glial) cells in retinal light damage of rats. *Neurosci Lett.* 185, 119-122.
- Guex-Crosier, Y. (1999): The pathogenesis and clinical presentation of macular edema in inflammatory diseases. *Doc Ophthalmol.* 97, 297-309.
- Gunnarson, E., Zelenina, M., Axehult, G., Song, Y., Bondar, A., Krieger, P., Brismar, H., Zelenin, S., Aperia, A. (2008): Identification of a molecular target for glutamate regulation of astrocyte water permeability. *Glia* 56, 587-596.
- Gunnarson, E., Song, Y., Kowalewski, J.M., Brismar, H., Brines, M., Cerami, A., Andersson, U., Zelenina, M., Aperia, A. (2009): Erythropoietin modulation of astrocyte water permeability as a component of neuroprotection. *Proc Natl Acad Sci USA.* 106, 1602-1607.
- Hernández, C., Fonollosa, A., García-Ramírez, M., Higuera, M., Catalán, R., Miralles, A., Garcí-Arumí, J., Simó, R. (2006): Erythropoietin is expressed in the human retina and it is highly elevated in the vitreous fluid of patients with diabetic macular edema. *Diabetes Care* 29, 2028-2033.

- Hirrlinger, P.G., Wurm, A., Hirrlinger, J., Bringmann, A., Reichenbach, A. (2008): Osmotic swelling characteristics of glial cells in the murine hippocampus, cerebellum, and retina in situ. *J Neurochem.* 105, 1405–1417.
- Hoffmann, E.K., Hougaard, C. (2001): Intracellular signalling involved in activation of the volume-sensitive K⁺ current in Ehrlich ascites tumour cells. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 130, 355-366.
- Hörle, S., Grüner, F., Kroll, P. (2002): Epidemiologie diabetischer Erblindung – eine Übersicht. *Klin Monbl Augenheilkd.* 219, 777-784.
- Housley, G.D., Bringmann, A., Reichenbach, A. (2009): Purinergic signaling in special senses. *Trends Neurosci.* 32, 128- 141.
- Iandiev, I., Tenckhoff, S., Pannicke, T., Biedermann, B., Hollborn, M., Wiedemann, P., Reichenbach, A., Bringmann, A. (2006): Differential regulation of Kir4.1 and Kir2.1 expression in the ischemic rat retina. *Neurosci Lett.* 396, 97–101.
- Iandiev, I., Wurm, A., Pannicke, T., Wiedemann, P., Reichenbach, A., Robson, S.C., Zimmermann, H., Bringmann, A. (2007): Ectonucleotidases in Müller glial cells of the rodent retina: Involvement in inhibition of osmotic cell swelling. *Purinergic Signal.* 3, 423-433.
- Inomata, Y., Hirata, A., Takahashi, E., Kawaji, T., Fukushima, M., Tanihara, H. (2004): Elevated erythropoietin in vitreous with ischemic retinal disease. *Neuroreport* 15, 877-879.
- Jeremic, A., Jeftinija, K., Stevanovic, J., Glavaski, A., Jeftinija, S. (2001): ATP stimulates calcium-dependent glutamate release from cultured astrocytes. *J Neurochem.* 77, 664-675.
- Jermak, C.M., Dellacroce, J.T., Heffez, J., Peyman G.A. (2007): Triamcinolone acetonide in ocular therapeutics. *Surv Ophthalmol.* 52, 503-522.
- Joussen, A.M., Murata, T., Tsujikawa, A., Kirchhof, B., Bursell, S.E., Adamis, A.P. (2001): Leukocyte-mediated endothelial cell injury and death in the diabetic retina. *Am J Pathol.* 158, 147-152.
- Joussen, A.M., Poulaki, V., Le, M.L., Koizumi, K., Esser, C., Janicki, H., Schraermeyer, U., Kociok, N., Fauser, S., Kirchhof, B., Kern, T.S., Adamis, A.P. (2004): A central role for inflammation in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *FASEB J.* 18, 1450-1452.
- Juen, S., Kieselbach, G.F. (1990): Electrophysiological changes in juvenile diabetics without retinopathy. *Arch Ophthalmol.* 108, 372-375.
- Junk, A.K., Mammis, A., Savitz, S.I., Singh, M., Roth, S., Malhotra, S., Rosenbaum, P.S., Cerami, A., Brines, M., Rosenbaum, D.M. (2002): Erythropoietin administration protects retinal neurons from acute ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci USA.* 99, 10659-10664.
- Juul, S.E., Anderson, D.K., Li, Y., Christensen, R.D. (1998): Erythropoietin and erythropoietin receptor in the developing human central nervous system. *Pediatr Res.* 40, 40-49.
- Kalisch, F., Wurm, A., Iandiev, I., Uckermann, O., Dilsiz, N., Reichenbach, A., Wiedemann, P., Bringmann, A. (2006): Atrial natriuretic peptide inhibits osmotic glial cell swelling in the ischemic rat retina: dependence on glutamatergic-purinergic signalling. *Exp Eye Res.* 83, 962- 971.
- Katsura, Y., Okano, T., Matsuno, K., Osako, M., Kure, M., Watanabe, T., Iwaki, Y., Noritake, M., Kosano, H., Nishigori, H., Matsuoka, T. (2005): Erythropoietin is highly elevated in vitreous fluid of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Diabetes Care* 28, 2252-2254.

- Kikkawa, U., Takai, Y., Minakuchi, R., Inoharag, S., Nishizuka, Y. (1982): Calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase from rat brain. Subcellular distribution, purification, and properties. *J Biol Chem.* 257, 13341-13348.
- Kimelberg, H.K. (1987): Anisotonic media and glutamate-induced ion transport and volume responses in primary astrocyte cultures. *J Physiol. (Paris)* 82, 294-303.
- Kimelberg, H.K., Goderie, S.K., Higman, S., Pang, S., Waniewski, R.A. (1990): Swelling-induced release of glutamate, aspartate, and taurine from astrocyte cultures. *J Neurosci.* 10, 1583-1591.
- Kimelberg, H.K. (2005): Astrocytic swelling in cerebral ischemia as a possible cause of injury and target for therapy. *Glia* 50, 389-397.
- Klatzo, I. (1967): Presidential address. Neuropathological aspects of brain edema. *J Neuropathol Exp Neurol.* 26, 1-14.
- Koshimura, K., Murakami, Y., Sohmiya, M., Tanaka, J., Kato, Y. (1999): Effects of erythropoietin on neuronal activity. *J Neurochem.* 72, 2565-2572.
- Kowluru, R.A., Kennedy, A. (2001): Therapeutic potential of anti-oxidants and diabetic retinopathy. *Expert Opin Investig Drugs.* 10, 1665-1676.
- Krügel, K., Wurm, A., Linnertz, R., Pannicke, T., Wiedemann, P., Reichenbach, A., Bringmann, A. (2010): Erythropoietin inhibits osmotic swelling of retinal glial cells by Janus kinase- and extracellular signal-regulated kinases1/2-mediated release of vascular endothelial growth factor. *Neuroscience* 165, 1147-1158.
- Lacombe, C. Mayeux, P. (1998): Biology of erythropoietin. *Haematologica* 83, 724-732.
- Lang, F., Busch, G.L., Ritter, M., Volkl, H., Waldegger, S., Gulbins, E., Haussinger, D. (1998): Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Physiol Rev.* 78, 247-306.
- Larsen, A.K., Osborne, N.N. (1996): Involvement of adenosine in retinal ischemia. Studies on the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 37, 2603-2611.
- Leal, E.C., Santiago, A.R., Ambrósio, A.F. (2005): Old and new drug targets in diabetic retinopathy: from biochemical changes to inflammation and neurodegeneration. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord.* 4, 421-434.
- Lees, G.J. (1991): Inhibition of sodium-potassium-ATPase: a potentially ubiquitous mechanism contributing to central nervous system neuropathology. *Brain Res Rev.* 16, 283-300.
- Levitzi, A. (2002): Tyrosine kinases as targets for cancer therapy. *Eur J Cancer.* 38, 11-18.
- Liang, D., Bhatta, S., Gerzanich, V., Simard, J.M. (2007): Cytotoxic edema: mechanisms of pathological cell swelling. *Neurosurg Focus.* 22, 1-9.
- Lieth, E., Gardner, T.W., Barber, A.J., Antonetti, D.A. (2000): Retinal neurodegeneration: early pathology in diabetes. *Clin Experiment Ophthalmol.* 28, 3-8.
- Linser, P., Moscona, A.A. (1979): Induction of glutamine synthetase in embryonic neural retina: localization of Müller fibers and dependence on cell interactions. *Proc Natl Acad Sci USA.* 76, 6476-6480.
- Liu, R., Suzuki, A., Guo, Z., Mizuno, Y., Urabe, T. (2006): Intrinsic and extrinsic erythropoietin enhances neuroprotection against ischemia and reperfusion injury in vitro. *J Neurochem.* 96, 1101-1110.

- Marmor, M.F. (1999): Mechanisms of fluid accumulation in retinal edema. *Doc Ophthalmol.* 97, 239–249.
- Marti, H.H. (2004): Erythropoietin and the hypoxic brain. *J Exp Biol.* 207, 3233-3242.
- McManus, M.L., Churchwell, K.B., Strange, K. (1995): Regulation of cell volume in health and disease. *N Engl J Med.* 333, 1260-1266.
- Miyake, K., Ibaraki, N., (2002): Prostaglandins and Cystoid Macular Edema. *Surv Ophthalmol.* 47, 203-218.
- Morgan, A., Burgoyne, R.D., Barclay, J.W., Craig, T.J., Prescott, G.R., Ciufo, L.F., Evans, G.J.O., Graham, M.E. (2005): Regulation of exocytosis by protein kinase C. *Biochem Soc Trans.* 33, 1341-1344.
- Morishita, E., Masuda, S., Nagao, M., Yasuda, Y., Sasaki, R. (1997): Erythropoietin receptor is expressed in rat hippocampal and cerebral cortical neurons, and erythropoietin prevents in vitro glutamate-induced neuronal death. *Neuroscience* 76, 105–116.
- Munro, K., Rees, S., O'Dowd, R., Tolcos, M. (2009): Developmental profile of erythropoietin and its receptor in guinea-pig retina. *Cell Tissue Res.* 336, 21- 29.
- Nagelhus, E.A., Horio, Y., Inanobe, A., Fujita, A., Haug, F.M., Nielsen, S., Kurachi, Y., Ottersen, O.P. (1999): Immunogold evidence suggests that coupling of K⁺ siphoning and water transport in rat retinal Müller cells is mediated by a coenrichment of Kir4.1 and AQP4 in specific membrane domains. *Glia* 26, 47–54.
- Nedergaard, M., Takano, T., Hansen, A.J. (2002): Beyond the role of glutamate as a neurotransmitter. *Nat Rev Neurosci.* 3, 748-755.
- Newman, E.A., Frambach, D.A., Odette, L.L. (1984): Control of extracellular potassium levels by retinal glial cell K⁺ siphoning. *Science* 225, 1174-1175.
- Newman, E.A. (1989): Potassium conductance block by barium in amphibian Müller cells. *Brain Res.* 498, 308-314.
- Newman, E.A., Zahs, K.R. (1997): Calcium waves in retinal glial cells. *Science* 275, 844–847.
- Newman, E.A., Zahs, K.R. (1998): Modulation of neuronal activity by glial cells in the retina. *J Neurosci.* 18, 4022–4028.
- Newman, E.A. (2003): Glial cell inhibition of neurons by release of ATP. *J Neurosci.* 23, 1659–1666.
- Nitta, K., Uchida, K., Kimata, N., Honda, K., Kobayashi, H., Kawashima, A., Yumura, W., Nihei, H. (1999): Recombinant human erythropoietin stimulates vascular endothelial growth factor release by glomerular endothelial cells. *Eur J Pharmacol.* 373, 121–124.
- Okutan, O., Turkoglu, O.F., Gok, H.B., Beskonakli, E. (2008): Neuroprotective effect of erythropoietin after experimental cold injury–induced vasogenic brain edema in rats. *Surg Neurol.* 70, 498–502.
- Ostwald, P., Park, S.S., Toledano, A.Y., Roth, S. (1997): Adenosine receptor blockade and nitric oxide synthase inhibition in the retina: impact upon post-ischemic hyperemia and the electroretinogram. *Vision Res.* 37, 3453-3461.
- Owada, S., Larsson, O., Arkhammar, P., Katz, A.I., Chibalin, A.V., Berggren, P.O., Bertorello, A.M. (1999): Glucose decreases Na⁺,K⁺-ATPase activity in pancreatic beta-cells. An effect mediated via Ca²⁺-independent phospholipase A2 and protein kinase C-dependent phosphorylation of the alpha-subunit. *J Biol Chem.* 274, 2000-2008.

- Pannicke, T., Iandiev, I., Uckermann, O., Biedermann, B., Kutzer, F., Wiedemann, P., Wolburg, H., Reichenbach, A., Bringmann, A. (2004): A potassium channel-linked mechanism of glial cell swelling in the postischemic retina. *Mol Cell Neurosci.* 26, 493–502.
- Pannicke, T., Uckermann, O., Iandiev, I., Wiedemann, P., Reichenbach, A., Bringmann, A. (2005a): Ocular inflammation alters swelling and membrane characteristics of rat Müller glial cells. *J Neuroimmunol.* 161, 145-154.
- Pannicke, T., Uckermann, O., Iandiev, I., Biedermann, B., Wiedemann, P., Perlman, I., Reichenbach, A., Bringmann, A. (2005b): Altered membrane physiology in Müller glial cells after transient ischemia of the rat retina. *Glia* 50, 1-11.
- Pannicke, T., Iandiev, I., Wurm, A., Uckermann, O., vom Hagen, F., Reichenbach, A., Wiedemann, P., Hammes, H., Bringmann, A. (2006): Diabetes alters osmotic swelling characteristics and membrane conductance of glial cells in rat retina. *Diabetes* 55, 633-639.
- Päsler, D., Gabriel, S., Heinemann, U. (2007): Two-pore-domain potassium channels contribute to neuronal potassium release and glial potassium buffering in the rat hippocampus. *Brain Res.* 1173, 14-26.
- Pasti, L., Zonta, M., Pozzan, T., Vicini, S., Carmignoto, G. (2001): Cytosolic calcium oscillations in astrocytes may regulate exocytotic release of glutamate. *J Neurosci.* 21, 477–484.
- Parpura, V., Basarsky, T.A., Liu, F., Jętrinija, K., Jętrinija, S., Haydon, P.G. (1994): Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. *Nature* 369, 744-747.
- Parpura, V., Haydon, P.G. (2000): Physiological astrocytic calcium levels stimulate glutamate release to modulate adjacent neurons. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97, 8629–8634.
- Pasti, L., Zonta, M., Pozzan, T., Vicini, S., Carmignoto, G. (2001): Cytosolic calcium oscillations in astrocytes may regulate exocytotic release of glutamate. *J Neurosci.* 21, 477–484.
- Reichenbach, A., Henke, A., Eberhardt, W., Reichelt, W., Dettmer, D. (1992): K⁺ ion regulation in retina. *Can J Physiol Pharmacol.* 70, 239-247.
- Reichenbach, A. (1999): Neuroglia-das andere zelluläre Element im Nervensystem: Die Müllersche Gliazelle. *Media Bibliothek, Pharmacia&Upjohn, Wessobrunn.*
- Reichenbach, A., Wurm, A., Pannicke, T., Iandiev, I., Wiedemann, P., Bringmann, A. (2007): Müller cells as players in retinal degeneration and edema. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 245, 627–636.
- Reichenbach, A. (2008): Die Wirbeltierretina – ein merkwürdiges Sinnesorgan. *Sitzungsberichte der Sächsischen Akademie der Wissenschaften zu Leipzig, Mathematisch-naturwissenschaftliche Klasse, Band 130, Heft 6.*
- Roth, S., Rosenbaum, P.S., Osinski, J., Park, S.S., Toledano, A.Y., Li, B., Moshfeghi, A.A. (1997): Ischemia induces significant changes in purine nucleoside concentration in the retina-choroid in rats. *Exp Eye Res.* 65, 771-779.
- Saint-Geniez, M., Maharaj, A.S.R., Walshe, T.E., Tucker, B.A., Sekiyama, E., Kurihara, T., Darland, D.C., Young, M.J., D'Amore, P.A. (2008): Endogenous VEGF is required for visual function: evidence for a survival role on müller cells and photoreceptors. *PLoS One.* 3, e3554.
- Shah, S.S., Tsang, S.H., Mahajan, V.B. (2009): Erythropoietin receptor expression in the human diabetic retina. *BMC Res Notes.* 2:234.
- Shen, X., Xu, G. (2009): Role of IL-1beta on the glutamine synthetase in retinal Müller cells under high glucose conditions. *Curr Eye Res.* 34, 727-736.

- Sirén, A.L., Ehrenreich, H. (2001): Erythropietin- a novel concept for neuroprotection. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 251, 179-184.
- Skatchkov, S.N., Eaton, M.J., Shuba, Y.M., Kucheryavykh, Y.V., Derst, C., Veh, R.W., Wurm, A., Iandiev, I., Pannicke, T., Bringmann, A., Reichenbach, A. (2006): Tandem-pore domain potassium channels are functionally expressed in retinal (Müller) glial cells. *Glia* 53, 266–276.
- Staub, F., Winkler, A., Peters, J., Kempfski, O., Kachel, V., Baethmann, A. (1994a): Swelling, acidosis, and irreversible damage of glial cells from exposure to arachidonic acid in vitro. *J Cereb Blood Flow Metab.* 14, 1030-1039.
- Staub, F., Winkler, A., Peters, J., Kempfski, O., Baethmann, A. (1994b): Mechanisms of glial swelling by arachidonic acid. *Acta Neurochir Suppl. (Wien)* 60, 20-23.
- Stitt, A.W., Simpson, D.A.C., Boocock, C., Gardiner, T.A., Murphy, G.M., Archer, D.B. (1998): Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors is regulated in eyes with intra-ocular tumors. *J Pathol.* 186, 306–312.
- Storkebaum, E., Lambrechts, D., Carmeliet, P. (2004): VEGF: once regarded as a specific angiogenic factor, now implicated in neuroprotection. *Bioessays* 26, 943–954.
- Takagi, H., Watanabe, D., Suzuma, K., Kurimoto, M., Suzuma, I., Ohashi, H., Ojima, T., Murakami, T. (2007): Novel role of erythropoietin in proliferative diabetic retinopathy. *Diabetes Res Clin Pract.* 77, 62–64.
- Tout, S., Chan-Ling, T., Holländer, H., Stone, J. (1993): The role of Müller cells in the formation of the blood-retinal barrier. *Neuroscience* 55, 291-301.
- Uckermann, O., Iandiev, I., Francke, M., Franze, K., Grosche, J., Wolf, S., Kohen, L., Wiedemann, P., Reichenbach, A., Bringmann, A. (2004): Selective staining by vital dyes of Müller glial cells in retinal wholemounts. *Glia* 45, 59–66.
- Uckermann, O., Kutzera, F., Wolf, A., Pannicke, T., Reichenbach, A., Wiedemann, P., Wolf, S., Bringmann, A. (2005): The glucocorticoid triamcinolone acetate inhibits osmotic swelling of retinal glial cells via stimulation of endogenous adenosine signaling. *J Pharmacol Exp Ther.* 315, 1036–1045.
- Uckermann, O., Wolf, A., Kutzera, F., Kalisch, F., Beck-Sickinger, A.G., Wiedemann, P., Reichenbach, A., Bringmann, A. (2006): Glutamate release by neurons evokes a purinergic inhibitory mechanism of osmotic glial cell swelling in the rat retina: activation by neuropeptide Y. *J Neurosci Res.* 83, 538–550.
- Unterberg, A.W., Stover, J., Kress, B., Kiening, K.L. (2004): Edema and brain trauma. *Neuroscience* 129, 1021-1029.
- Van Dam, P.S. (2002): Oxidative stress and diabetic neuropathy: pathophysiological mechanisms and treatment perspectives. *Diabetes Metab Res Rev.* 18, 176-184.
- Verdonck, O., Lahrech, H., Francony, G., Carle, O., Farion, R., Van de Looij, Y., Remy, C., Segebarth, C., Payen, J.F. (2007): Erythropoietin protects from post-traumatic edema in the rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab.* 27, 1369-1376.
- Waldegger, S., Steuer, S., Risler, T., Heidland, A., Capasso, G., Massry, S., Lang, F. (1998): Mechanisms and clinical significance of cell volume regulation. *Nephrol Dial Transplant.* 13, 867-874.
- Wang, L., Chopp, M., Gregg, S.R., Zhang, R.L., Teng, H., Jiang, A., Feng, Y., Zhang, Z.G. (2008): Neural progenitor cells treated with EPO induce angiogenesis through the production of VEGF. *J Cerebral Blood Flow Metab.* 28, 1361-1368.

- Ward, M.M., Flechter, E.L. (2009): Subsets of retinal neurons and glia express P2Y1 receptors. *Neuroscience* 160, 555-566.
- Watanabe, D., Suzuma, K., Matsui, S., Kurimoto, M., Kiryu, J., Kita, M., Suzuma, I., Ohashi, H., Ojima, T., Murakami, T., Kobayashi, T., Masuda, S., Nagao, M., Yoshimura, N., Takagi, H. (2005): Erythropoietin as a retinal angiogenic factor in proliferative diabetic retinopathy. *N Engl J Med.* 353, 782-792.
- Weishaupt, J.H., Rohde, G., Pölking, E., Siren, A.L., Ehrenreich, H., Bähr, M. (2004): Effect of erythropoietin axotomy-induced apoptosis in rat retinal ganglion cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 45, 1514-1522.
- Weuste, M., Wurm, A., Iandiev, I., Wiedemann, P., Reichenbach, A., Bringmann, A. (2006): HB-EGF: Increase in the ischemic rat retina and inhibition of osmotic glial cell swelling. *Biochem Biophys Res Commun.* 347, 310–318.
- Winkler, A.S., Baethmann, A., Peters, J., Kempfski, O., Staub, F. (2000): Mechanisms of arachidonic acid induced glial swelling. *Brain Res Mol Brain Res.* 76, 419–423.
- Wurm, A., Pannicke, T., Wiedemann, P., Reichenbach, A., Bringmann, A. (2008): Glial cell-derived glutamate mediates autocrine cell volume regulation in the retina: activation by VEGF. *J Neurochem.* 104, 386-399.
- Wurm, A., Lipp, S., Pannicke, T., Linnertz, R., Färber, K., Wiedemann, P., Reichenbach, A., Bringmann, A. (2009a): Involvement of A1 adenosine receptors in osmotic volume regulation of retinal glial cells in mice. *Molecular Vision* 15, 1858-1867.
- Wurm, A., Erdmann, I., Bringmann, A., Reichenbach, A., Pannicke, T. (2009b): Expression and function of P2Y receptors on Müller cells of the postnatal rat retina. *Glia* 57, 1680-1690.
- Ysuhara, T., Shingo, T., Date, I. (2004): The potential role of vascular endothelial growth factor in the central nervous system. *Rev Neurosci.* 15, 293-307.
- Zachary, I. (2003): VEGF signalling: integration and multi-tasking in endothelial cell biology. *Biochem Soc Trans.* 31, 1171-1177.
- Zhu, B., Wang, W., Gu, Q., Xu, X. (2008): Erythropoietin protects retinal and glial cells in early-stage streptozotocin-induced diabetic rats. *Exp Eye Res.* 86, 375-382.
- Zhang, J., Wu, Y., Jin, Y., Ji, F., Sinclair, S.H., Luo, Y., Xu, G., Lu, L., Dai, W., Yanoff, M., Li, W., Xu, G.T. (2008): Intravitreal injection of erythropoietin protects both retinal vascular and neuronal cells in early diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 49, 732-742.

7 Anlagen

Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

.....
Datum

.....
Unterschrift

Publikationsliste

Krügel, K., Wurm, A., Linnertz, R., Pannicke, T., Wiedemann, P., Reichenbach, A., Bringmann, A. (2010): Erythropoietin inhibits osmotic swelling of retinal glial cells by Janus kinase- and extracellular signal-regulated kinases1/2-mediated release of vascular endothelial growth factor. *Neuroscience* 165, 1147-1158.

Löffler, S., Wurm, A., Kutzer, F., Pannicke, T., **Krügel, K.**, Linnertz, R., Wiedemann, P., Reichenbach, A., Bringmann, A. (2010): Serum albumin induces osmotic swelling of rat retinal glial cells. *Brain Res.* 1317, 268-276.

Karl, A., Wurm, A., Pannicke, T., **Krügel, K.**, Obara-Michlewska, M., Wiedemann, P., Reichenbach, A., Albrecht, J., Bringmann, A.: Synergistic action of hypoosmolarity and glutamine in inducing acute swelling of retinal glial (Müller) cells. *Glia*, im Druck.

Danksagung

Mein Dank gilt ganz besonders Frau Dr. Antje Wurm für die Einführung in die Arbeit und die inhaltliche und praktische Betreuung während meiner Zeit am Paul-Flechsig-Institut für Hirnforschung der Universität Leipzig.

Bei den Herren Professoren Andreas Reichenbach und Andreas Bringmann und Dr. Thomas Pannicke möchte ich mich für ihre hilfreiche Unterstützung und Betreuung bedanken.

Des Weiteren gilt mein Dank allen Mitarbeitern der Abteilung Neurophysiologie des Paul-Flechsig-Institutes für Hirnforschung für das angenehme Arbeitsklima und eine schöne Zeit am Institut.